

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ
INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FIOCRUZ/PR**

**DENGUE: CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE
VIRULÊNCIA UTILIZANDO A TECNOLOGIA DE GENOMAS INFECCIOSOS**

LUANA DE BORBA

**CURITIBA
MARÇO 2010**

LUANA DE BORBA

**DENGUE: CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DE
VIRULÊNCIA UTILIZANDO A TECNOLOGIA DE GENOMAS INFECCIOSOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Claudia N. Duarte dos Santos

CURITIBA

2010

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

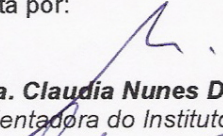
Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

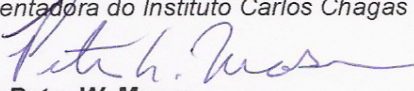
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

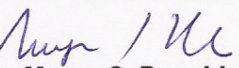
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos

Orientadora do Instituto Carlos Chagas - ICC


Dr. Peter W. Mason

Novartis Massachusetts – Texas - UTMB


Dra. Myrna C. Bonaldo

FIOCRUZ - ICC/RJ

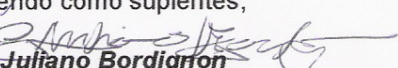

Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz

Instituto Carlos Chagas - ICC

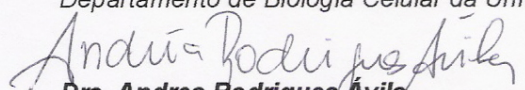

Dr. Stênio Perdigão Fragoso

Instituto Carlos Chagas - ICC

E tendo como suplentes,


Dr. Juliano Bordignon

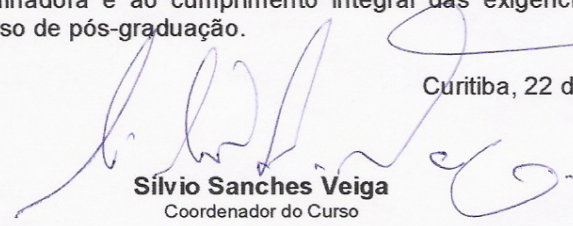
Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná


Dra. Andrea Rodrigues Ávila

Instituto Carlos Chagas - ICC

Após argüir o(a) doutorando(a) **Luana de Borba**, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: **“Dengue: Caracterização de marcadores moleculares de virulência utilizando a tecnologia de genomas infecciosos”**, é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, dentro da área de concentração em **Biologia Celular e Molecular**.

A obtenção do título de Doutor está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.


Curitiba, 22 de março de 2010

Silvio Sanches Veiga
Coordenador do Curso

CENTRO POLITÉCNICO – CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-FONE: (41) 3361-

1676 FAX 3266-2042 – E-Mail- pgbiocel@ufpr.br – www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA - PARANÁ



Aos meus pais, Itané e Vanize, e ao meu irmão,
Henrique, por toda dedicação, confiança,
paciência, compreensão, e que nunca mediram
esforços para me ajudar a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Itané de Borba e Vanize R. M. de Borba, que, com carinho, amor e paciência, me ensinaram a trilhar os caminhos em busca de meus ideais e sonhos. A todos os meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. E ao Carlos A. Palacios, por me incentivar, apoiar e tranquilizar perante os obstáculos, independente da distância física que nos separa.

À Dra. Claudia N. Duarte dos Santos, agradeço pelos muitos anos de confiança em meu trabalho, sempre disponibilizando o espaço e oportunidade para meu desenvolvimento profissional.

Aos diretores e fundadores do Instituto Carlos Chagas, Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Marco Aurélio Krieger, Dr. Stênio P. Fragoso e Dra. Claudia N. Duarte dos Santos, agradeço pela confiança e oportunidade de fazer parte da equipe, disponibilizando recursos e um ambiente de alta tecnologia, fazendo com que nosso trabalho seja cada vez melhor.

Agradeço ao Dr. Peter W. Mason, que com paciência e dedicação, me ensinou toda a base da tecnologia utilizada neste trabalho. Sem este conhecimento, o trabalho não seria possível.

A todos os amigos e colegas que fazem ou fizeram parte do laboratório de Virologia Molecular do ICC: Ana Luiza P. Mosimann, Andrea C. Koishi, Aurélio S. Zeferino, Camilla N. da Costa, Daisy M. Strottmann, Eleonora Campos, Federico Hoffmann, Florencia Meyer, Giovanny C. A. Mazzarotto, Guilherme F. Silveira, Juliano Bordignon, Lorena C. Pena, Marina R. T de Araujo, Mário H. Queiroz, Meg C. C. Costa, Meri B. Nogueira, Paula R. Zanello, Sonia M. Raboni, Suzana Carstensen e Vanessa Stella, muito obrigada por todo apoio, crítica e companheirismo ao longo de todos estes anos. Em especial à Ana, Daisy, Marina, Suzana e Vanessa que sempre estiveram dispostas a auxiliar em meus experimentos práticos na minha ausência do laboratório, à Ana pela paciência, sugestões e revisão da escrita, e ao Giovanny por todo apoio e colaboração nos experimentos animais.

À Dra. Lucia Noronha e às técnicas, Ana Paula Martins e Marina Luise Viola de Azevedo, do Laboratório de Patologia Clínica da PUC/PR, agradeço pela colaboração, execução das lâminas histológicas e orientação nas análises de histopatologia por microscopia óptica.

Agradeço a todo pessoal do preparo, Nilson J. Fidencio, Vanessa M. dos Santos, Tânia R. Schepainski, Rafael C. Brito e Janaina S. da Silva, pela dedicação e preparo cuidadoso dos materiais e reagentes indispensáveis para realização de nossos trabalhos. Aos funcionários da manutenção, Leszek Gadjia e Frederico Torres Martins, por estarem sempre dispostos a realizar pequenos detalhes que fazem diferença. Ao Paulo R. C. Arauco por todo auxílio na utilização do sequenciador automático, e a todos da secretaria do ICC, Luiz C. Casarotto, Edilaine Azevedo, Maria Cristina P. Barreto e Marcele T. N. Stimamiglio, e da secretaria da UFPR, Marlene B. de Camargo, pela ajuda em todas as questões burocráticas necessárias, facilitando nossa jornada.

Agradeço a todos os demais colegas e amigos do ICC aqui não mencionados, pelo companheirismo, sempre dando uma ajudinha aqui e outra ali.

Aos membros da banca, Dr. Peter W. Mason, Dra. Myrna C. Bonaldo, Dr. Stênio P. Fragoso e Dr. Bruno D. Muniz, e suplentes, Dr. Juliano Bordignon e Dra. Andrea A. Ávila, por aceitarem o convite de participar desta banca.

Ao TECPAR, agradeço por conceder o espaço do biotério, sem o qual este trabalho não seria possível. Aos órgãos de fomento, Fundação Araucária, PROSUL, FIOCRUZ e CNPq pelo apoio financeiro, e à CAPES pela concessão da bolsa.

Luana de Borba

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

*Somente aqueles que arriscam ir um pouco mais longe,
sabem até onde podem chegar!*

RESUMO

A dengue é hoje a principal arbovirose tropical, em termos de morbidade e mortalidade, e é transmitida ao homem através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*. O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e possui 4 sorotipos (DENV1-4), e até o momento não existe uma vacina disponível ou tratamento específico para a dengue. A infecção por qualquer um dos sorotipos pode causar desde quadros assintomáticos, febre clássica da dengue, ou ainda casos graves da doença, com eventos hemorrágicos, e eventualmente óbito. Dados recentes têm demonstrado que o perfil das manifestações clínicas da doença tem modificado nos últimos anos, e o aparecimento de episódios de encefalite associados à infecção pelo DENV tem aumentado significativamente. Com o intuito de estudar a neuropatologia associada à infecção por DENV, Després *et al.* (1998) e Bordignon *et al.* (2007), utilizando modelo murino, geraram variantes de DENV1 altamente neurovirulentas, que se replicam eficientemente no SNC de camundongos. Os determinantes genéticos potencialmente responsáveis pelo fenótipo neurovirulento dessas variantes virais mapeiam nas proteínas E (E402 e E405) e NS3 (NS3-209, NS3-435 e NS3-480). Para confirmar o envolvimento dessas mutações e visando compreender alguns aspectos dos mecanismos moleculares envolvidos na neuropatogênese da dengue, foram gerados clones infecciosos recombinantes contendo cada uma das mutações isoladamente ou em conjunto. Os vírus gerados a partir desses clones foram avaliados quanto ao seu potencial de replicação em células de inseto, infectividade no SNC de camundongos Swiss neonatos, modulação de resposta imune e análises histopatológicas do tecido cerebral de animais infectados. Foi observado que os vírus contendo as mutações NS3-435, NS3-480, E405/NS3-435 ou E402/NS3-480 eram capazes de provocar sintomas similares aos das cepas neurovirulentas em camundongos, como sinais de encefalite e paralisia parcial dos membros inferiores. Os grupos de animais infectados com os outros vírus recombinantes exibiram comportamento normal, sugerindo que as mutações NS3-435 e NS3-480 desempenhem um papel importante na neuropatogênese da dengue em camundongos. A replicação viral no SNC, avaliada por qPCR, foi maior nos animais inoculados com os vírus E405/NS3-435 e E402/NS3-480, que tiveram altas taxas de mortalidade. Além disso, os mesmos grupos de animais apresentaram uma maior modulação na transcrição de genes relacionados à resposta imune inata. Esse conjunto de dados indica que esses vírus são capazes de se replicarem de forma eficiente no SNC dos animais, desencadeando uma resposta imune exacerbada que está provavelmente envolvida na imunopatogênese da dengue. As análises histológicas das amostras de tecido cerebral dos animais evidenciaram a presença de infiltrado mononuclear em vasos, necrose neuronal, nódulo microglial, além de meningite, moderada a aguda, em todas as amostras, sendo os danos de maior extensão nos animais inoculados com os vírus E405/NS3-435 e E402/NS3-480. Os resultados gerados neste trabalho indicaram que vírus recombinantes contendo mutações pontuais no domínio helicase da proteína NS3 apresentaram maior habilidade de replicação e produção de partículas virais infectivas no SNC murino, causando encefalite e altas taxas de mortalidade. A geração de vírus contendo a dupla de mutações nas proteínas helicase e E, parece potencializar este efeito aumentando o dano no SNC, a resposta imune e a taxa de mortalidade dos animais. Atualmente estamos avaliando o comportamento biológico de novos vírus recombinantes exibindo diferentes aminoácidos na posição NS3-480 e estudando a interação da NS3hel com fatores virais e celulares, visando desvendar alguns aspectos relacionados à neuropatogênese da dengue.

Palavras-chave: Vírus da dengue sorotipo 1. Clone infeccioso. Modelo murino. Neurovirulência. Marcadores moleculares de virulência. Proteína E. Proteína NS3.

ABSTRACT

Nowadays, dengue is the main tropical arbovirus in terms of morbidity and mortality and is transmitted to humans by the bite of mosquitoes of the genus *Aedes*. The dengue virus belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, and has 4 characterized serotypes (DENV1-4), and so far there is no vaccine available. The infection by any of the serotypes can cause asymptomatic cases, classical dengue fever, or severe cases of the disease, hemorrhagic events, and eventually death. Recent data have shown that the profile of the clinical manifestations of the disease has changed in recent years and the number of episodes of encephalitis associated with DENV infection has increased significantly. In order to study the neuropathology associated with infection by DENV, Després *et al.* (1998) and Bordignon *et al.* (2007), using a mouse model, generated DENV1 variants highly neurovirulent, which replicate efficiently in the CNS of mice. The genetic determinants potentially responsible for the neurovirulent phenotype of these variants map in the E protein (E402 and E405) and NS3 (NS3-209, NS3-435 and NS3-480). To confirm the involvement of these mutations and trying to understand some aspects of the molecular mechanisms involved in the neuropathogenesis of dengue, infectious recombinant clones were generated containing each mutation alone or in combination. Viruses generated from these clones were assessed for their potential of replication in insect cells, infectivity in the CNS of newborn Swiss mice, modulation of immune response and pathological examinations of brain tissue from infected animals. It was observed that viruses containing mutations NS3-435, NS3-480, E405/NS3-435 or E402/NS3-480 were able to cause similar symptoms to the neurovirulent strains in mice, as signs of encephalitis and partial paralysis of limbs. The groups of animals infected with other recombinant viruses exhibited normal behavior, suggesting that mutations NS3-435 and NS3-480 play an important role in the neuropathogenesis of dengue in mice. Viral replication in the CNS, evaluated by qPCR, was higher in animals inoculated with the virus E405/NS3-435 and E402/NS3-480, which had high mortality rates. Moreover, the same groups of animals showed a greater modulation in the transcription of genes related to innate immune response. This set of data indicates that these viruses are able to replicate efficiently in the CNS of animals, triggering an exacerbated immune response that is probably involved in the immunopathogenesis of dengue. Histological analysis of samples of brain tissue of animals showed the presence of mononuclear cells in blood vessels, neuronal necrosis, microglial nodules, and meningitis, moderate to acute, in all the samples, and the larger damage was observed in the animals inoculated with the virus E405/NS3-435 and E402/NS3-480. The results generated in this study indicated that recombinant viruses containing mutations in the helicase domain of NS3 protein showed higher ability of replication and production of infective viral particles in the murine CNS, causing encephalitis and high mortality rates. The generation of viruses containing double mutations in helicase proteins and E, appears to enhance this effect by increasing the damage in the CNS, the immune response and the mortality rate of animals. We are currently evaluating the biological performance of new recombinant viruses exhibiting different amino acid at position NS3-480 and examining the interaction of NS3hel with viral and cellular factors, in order to uncover some aspects related to the neuropathogenesis of dengue.

Keywords: Dengue virus serotype 1. Infectious clone. Murine model. Neurovirulence. Molecular markers of virulence. E protein. NS3 protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 –	Distribuição mundial das áreas de risco de dengue (laranja) em 2009.....	27
Figura 1.2 –	Reinfestação com mosquito <i>Aedes aegypti</i> na América Latina e Caribe.....	29
Figura 1.3 –	Número de casos de dengue no Brasil de 1986 a 2009.....	30
Figura 1.4 –	Representação de partículas de <i>Flavivirus</i> imaturas.....	32
Figura 1.5 –	Representação esquemática da organização do genoma do vírus da dengue e clivagem da poliproteína em três proteínas estruturais e sete não-estruturais por proteases viral e do hospedeiro.....	33
Figura 1.6 –	Representação de uma porção das sequências e predição das estruturas secundárias das regiões 5’NTR e 3’NTR, indicando seus elementos.....	34
Figura 1.7 –	Representação esquemática da vista lateral de um homodímero da proteína E e seus elementos.....	37
Figura 1.8 –	Representação esquemática do genoma e estrutura tri-dimensional do domínio helicase da proteína NS3 de JEV.....	40
Figura 1.9 –	Representação gráfica do mecanismo de fusão mediado por proteínas virais de fusão da classe II.....	43
Figura 1.10 –	Esquema da morfogênese do vírus da dengue.....	45
Figura 1.11 –	Esquema da neuroadaptação da cepa FGA/89 em modelo murino.....	49
Figura 3.1 –	Representação esquemática das etapas da amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse (fragm A, fragm B e fragm fusão) e as respectivas enzimas de restrição utilizadas para cada estratégia de clonagem.....	57
Figura 3.2 –	Mapa do plasmídeo <i>pGEM-T Easy</i> (Promega).....	58
Figura 3.3 –	Representação esquemática do mapa do genoma infeccioso pBACDV1.....	62

Figura 3.4 –	Representação esquemática da digestão dos clones pBACDV1 e E402pGEM ou E405pGEM (Emut-pGEM) com as enzimas de restrição NotI e MluI.....	63
Figura 3.5 –	Representação esquemática da digestão do clone pBACDV1 e do fragmento de PCR NS3-209 com as enzimas de restrição MluI e BsiWI.....	63
Figura 3.6 –	Representação esquemática da digestão dos clones pBACDV1 e NS3-435-pGEM com as enzimas de restrição BsiWI e RsrII.....	64
Figura 3.7 –	Representação esquemática da digestão do clone pBACDV1 e do fragmento de PCR NS3-480 com as enzimas de restrição BsiWI e NheI.....	64
Figura 3.8 –	Representação esquemática da digestão do clone pBACDV1 com enzimas de restrição SmaI.....	72
Figura 4.1 –	Localização das mutações da proteína de Envelope.....	91
Figura 4.2 –	Localização das mutações na proteína NS3.....	92
Figura 4.3 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amplificações dos fragmentos mutados.....	93
Figura 4.4 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreparações em <i>pGEM-T Easy</i> dos clones confirmados por sequenciamento.....	94
Figura 4.5 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das digestões dos fragmentos contendo as mutações para cada estratégia.....	95
Figura 4.6 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs das minipreps dos clones E402pBAC.....	97
Figura 4.7–	Representação esquemática do perfil da digestão BstBI confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E405pBAC.....	98
Figura 4.8 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E405pBAC.....	98
Figura 4.9 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs das minipreps dos clones E405pBAC.....	99
Figura 4.10 –	Representação esquemática do perfil da digestão EcoRV confirmatória dos PCRs de colônia dos clones NS3-209pBAC....	100

Figura 4.11 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones NS3-209pBAC.....	100
Figura 4.12 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs a partir das <i>minipreps</i> dos clones NS3-209pBAC.....	101
Figura 4.13 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs das minipreps dos clones NS3-435pBAC.....	102
Figura 4.14 –	Representação esquemática do perfil da digestão BsaBI confirmatória dos PCRs de colônia dos clones NS3-480pBAC....	102
Figura 4.15 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones NS3-480pBAC.....	103
Figura 4.16 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs das minipreps dos clones NS3-480pBAC.....	104
Figura 4.17 –	Esquema das estratégias dos clones duplo e triplo mutantes pela substituição de fragmentos. Nos clones E405/NS3-435, E402/NS3-209 e E402/NS480, as cores representam o <i>backbone</i> e fragmentos utilizado para a clonagem da segunda mutação. As estrelas pretas representam a localização de cada mutação.....	105
Figura 4.18 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das digestões dos fragmentos contendo as mutações para estratégias dos duplos mutantes.....	105
Figura 4.19 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação dos PCRs de colônia dos clones E405/NS3-435.....	106
Figura 4.20 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação e digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E402/NS3-209.....	107
Figura 4.21 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação e digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E402/NS3-480.....	108
Figura 4.22 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps dos clones duplo mutantes.....	108
Figura 4.23 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação dos PCRs das minipreps E402/NS3-209 (10, 13 e 17) e E402/NS3-480 (89, 90 e 91).....	109

Figura 4.24 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação e digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E402/NS3-209/NS3-480.....	110
Figura 4.25 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos clones triplo mutantes.....	111
Figura 4.26 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das <i>minipreps</i> de cada clone confirmado por sequenciamento.....	112
Figura 4.27 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das digestões SwaI das <i>minipreps</i> de cada clone confirmado por sequenciamento.....	113
Figura 4.28 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos RNAs resultantes das transcrições <i>in vitro</i> de cada clone.....	114
Figura 4.29 –	Representação gráfica dos títulos virais obtidos nas diferentes metodologias de transfecção em células de inseto (em azul) e mamífero (em vermelho).....	115
Figura 4.30 –	Representação gráfica dos títulos virais obtidos na transfecção dos clones recombinantes em cultura de células de inseto.....	116
Figura 4.31 –	Representação gráfica dos títulos virais obtidos nas passagens 1 e 2 dos vírus gerados a partir dos clones recombinantes, em cultura de células de inseto.....	117
Figura 4.32 –	Eletroforeses em gel de agarose 0,8% das amplificações por PCR dos genomas completos dos vírus recombinantes.....	120
Figura 4.33A –	Alinhamento de aminoácidos das amostras pBACDV1, E402pBAC_cl.12.2, E405pBAC_cl.9.13, NS3-209pBAC_cl.85, NS3-435pBAC_cl.11.4, NS3-480pBAC_cl.9, E402/NS3-209_cl.17, E402/NS3-480_cl.89, E405/NS3-435_cl.3 e E402/NS3-209/NS3-480_cl.27.....	121
Figura 4.33B –	Alinhamento de aminoácidos das amostras pBACDV1, E402pBAC_cl.12.2, E405pBAC_cl.9.13, NS3-209pBAC_cl.85, NS3-435pBAC_cl.11.4, NS3-480pBAC_cl.9, E402/NS3-209_cl.17, E402/NS3-480_cl.89, E405/NS3-435_cl.3 e E402/NS3-209/NS3-480_cl.27, destacando as regiões de localização das mutações estudadas.....	122
Figura 4.34 –	Efeito citopático produzido pelos vírus recombinantes em cultura de células de inseto C6/36 nos tempos de 5, 6 e 7 dias pós-infecção.....	124

Figura 4.35 –	Análise comparativa da reação de imunofluorescência dos vírus recombinantes em cultura de células de inseto C6/36 com 5 dias pós-infecção.....	126
Figura 4.36 –	Representação gráfica da sobrevivência dos animais inoculados i.c. com pBACDV1, no ensaio de DL ₅₀	128
Figura 4.37 –	Representação gráfica da sobrevivência dos animais inoculados com os vírus recombinantes e controles ao longo de 21 dias.....	130
Figura 4.38 –	Resultado da amplificação por qPCR para TMEV nas amostras dos vírus recombinantes e das cepas neuroadaptadas FGA/NA-P6 e FGA/NA-d1d.....	131
Figura 4.39 –	Representação gráfica da amplificação do RNA viral por qPCR dos vírus recombinantes e das cepas neuroadaptadas FGA/NA-P6 e FGA/NA-d1d.....	132
Figura 4.40 –	Quantificação da modulação de genes diferencialmente expressos durante a infecção do SNC de camundongos com os vírus recombinantes gerados neste trabalho.....	134
Figura 4.41 –	Ilustração das regiões do cérebro e local de inoculação dos vírus.....	135
Figura 4.42 –	Histopatologia do córtex fronto-parietal do SNC de camundongos, destacando os critérios que caracterizam o quadro de encefalite, lâminas coradas com hematoxilina-eosina.	137
Figura 4.43 –	Histopatologia do SNC de camundongos inoculados com vírus recombinantes, áreas da meninge, córtex frontal e córtex temporal.....	138
Figura 4.44 –	Análises por imunohistologia do SNC de camundongos inoculados com vírus recombinantes.....	140
Figura 4.45 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amplificações dos novos fragmentos mutados NS3-480.....	143
Figura 4.46 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amplificações por PCR de fusão dos novos fragmentos mutados NS3-480.....	143
Figura 4.47 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% das digestões BsiWI/NheI dos fragmentos contendo as novas mutações NS3-480.....	144
Figura 4.48 –	Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos novos clones NS3-480 com endonuclease de restrição BsaBI.....	145

Figura 4.49 –	Estrutura química dos aminoácidos escolhidos para clonagem na posição NS3-480.....	146
Figura 4.50 –	Eletroforeses em gel de agarose 0.8% dos novos clones NS3-480.....	147

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 –	Substituições de aminoácidos identificadas nos genomas dos vírus neuroadaptados FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6, em comparação com a cepa parental FGA/89 e o genoma do clone infeccioso pBACDV1.....	49
Quadro 3.1 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse para clonagem.....	56
Quadro 3.2 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento dos possíveis clones recombinantes clonados em <i>pGEM-T Easy</i>	61
Quadro 3.3 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação por PCR de colônia e enzimas de restrição utilizadas para digestão dos PCRs, para confirmação de clones.....	66
Quadro 3.4 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de PCR dos possíveis clones recombinantes clonados em pBAC...	68
Quadro 3.5 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento dos PCR dos possíveis clones recombinantes clonados em pBAC.....	69
Quadro 3.6 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos PCR dos possíveis clones, duplos e triplo mutante, para confirmação por sequenciamento.....	71
Quadro 3.7 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação por PCR do genoma completo dos clones a partir do RNA dos vírus purificados por gradiente de sacarose.....	77
Quadro 3.8 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento do genoma completo dos clones a partir das amplificações por PCRs dos vírus purificados em gradiente de sacarose.....	79
Quadro 3.9 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reações de amplificação por qPCR.....	85
Quadro 3.10 –	Identificação dos genes e vias escolhidas para o estudo do perfil da expressão gênica no tecido cerebral de camundongos infectados com os vírus recombinantes e controles.....	85

Quadro 3.11 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação por qPCR para o estudo do perfil da expressão gênica no tecido cerebral de camundongos infectados com os vírus recombinantes e controles.....	87
Quadro 3.12 –	Novos aminoácidos selecionados para clonagem na posição NS3-480, para avaliação da importância da característica do aminoácido no processo de neurovirulência. Identificado em azul, o aminoácido do vírus parental não virulento FGA/89, e em vermelho, o aminoácido na cepa neurovirulenta FGA/NA-P6.....	89
Quadro 3.13 –	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos NS3-480.....	90
Quadro 4.1 –	Resumo da identificação dos clones gerados.....	111
Quadro 4.2 –	Classificação da lesão observada no tecido cerebral dos camundongos infectados com os diferentes vírus, de acordo com o grau de comprometimento.....	136
Quadro 4.3 –	Compilação resumida dos resultados obtidos com os clones construídos neste trabalho, com o respectivo esquema da localização de cada mutação.....	142

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	– por cento
∞	– infinito
α	– alfa
4G2	– anticorpo monoclonal anti-Envelope, <i>Flavivirus</i> -específico
Å	– angstrom
aa	– aminoácidos
ADE	– fenômeno dos anticorpos potencializadores da infecção (<i>antibody dependent-enhancement</i>)
Ala	– aminoácido alanina
AP61	– linhagem celular de mosquito <i>Aedes pseudocutellaris</i>
Arg	– aminoácido arginina
Asn	– aminoácido asparagina
AVE	– tampão de eluição de extração de RNA
β	– beta
BAC	– cromossomo artificial de bactéria (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BCIP	– <i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
BeAn	– cepa de baixa virulência do vírus da encefalomielite murina de Theiler
BHK-21	– linhagem celular de mamífero – <i>baby hamster kidney</i>
BR/90	– cepa de vírus da dengue sorotipo 1
C6/36	– linhagem celular de glândula salivar de mosquito <i>Aedes albopictus</i>
C1r	– gene <i>complement component 1, subcomponent r</i>
C3a	– elemento do sistema complemento
C5a	– elemento do sistema complemento
C	– proteína de capsídeo do vírus da dengue
CaCl₂	– cloreto de cálcio
Ccl5	– gene ligante de quimiocina 5
CCR5	– receptor do gene Ccl5
cDNA	– DNA complementar

CEP/UFPR	– Conselho de ética em pesquisa da Universidade Federal do Paraná
cl.	– clone
CMC	– carboxi metil celulose
CNS	– sistema nervoso central (<i>central nervous system</i>)
CO₂	– gás carbônico
CPE	– efeito citopático
CR	– complexo de replicação viral
cryoEM	– crio-microscopia eletrônica
CSs	– regiões de sequências conservadas (<i>conserved sequences</i>)
C-terminal	– porção carboxi-terminal
DA	– cepa de baixa virulência do vírus da encefalomielite murina de Theiler
DAB	– 3,3' - diaminobenzidina
DCC	– dengue com complicação
DC-SIGN	– receptor celular (<i>dendritic-cell-specific ICAM-grabbing non-integrin</i>)
DEAH	– sequência de aminoácidos do motivo II das RNA helicases, aspartato-glutamato-alanina-histidina
DENV1	– vírus da dengue sorotipo 1
DENV2	– vírus da dengue sorotipo 2
DENV3	– vírus da dengue sorotipo 3
DENV4	– vírus da dengue sorotipo 4
DF	– febre da dengue (dengue fever)
DHF	– febre hemorrágica da dengue (<i>dengue hemorrhagic fever</i>)
DL50	– 50% da dose letal
DNA	– ácido desoxirribonucléico
dpi	– dias pós inoculação ou infecção
Dra	– doutora
DSS	– síndrome do choque da dengue (<i>dengue shock syndrome</i>)
E	– aminoácido ácido glutâmico
E	– proteína de envelope do vírus da dengue

E402pBAC	– clone infeccioso de dengue 1 pBACDV1 contendo a mutação na posição 402 da proteína de envelope
E402/NS3-209	– clone infeccioso de dengue 1 pBACDV1 contendo as mutações nas posições 402 da proteína de envelope e 209 da proteína NS3
E402/NS3-480	– clone infeccioso de dengue 1 pBACDV1 contendo as mutações nas posições 402 da proteína de envelope e 480 da proteína NS3
E405pBAC	– clone infeccioso de dengue 1 pBACDV1 contendo a mutação na posição 405 da proteína de envelope
E405/NS3-435	– clone infeccioso de dengue 1 pBACDV1 contendo as mutações nas posições 405 da proteína de envelope e 435 da proteína NS3
EB	– tampão de eluição (elution buffer)
EDTA	– Diaminoethane-tetraacetic acid
F	– aminoácido fenilalanina
FA	– cepa neurovirulenta do vírus da encefalomielite murina de Theiler
ffu	– unidade formadora de foco (focus forming unit)
ffu/mL	– unidade formadora de foco por mililitro de cultura
FGA/NA-d1d	– cepa neurovirulenta do vírus da dengue sorotipo 1
FGA/NA-P6	– cepa neurovirulenta do vírus da dengue sorotipo 1
FGA/89	– cepa de vírus da dengue tipo 1
fragm	– fragmento
g	– grama
G	– aminoácido glicina
GBS	– síndrome de Guillain-Barré
GDVII	– cepa neurovirulenta do vírus da encefalomielite murina de Theiler
GenBank	– base de dados de sequências de livre acesso produzida pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI)
Gln	– aminoácido glutamina
Glu	– aminoácido ácido glutâmico
Gly	– aminoácido glicina
GRP78/BiP	– receptor celular
GSGKT	– sequência de aminoácidos do motivo I das RNA helicases, glicina-serina-glicina-lisina-treonina

H	– aminoácido histidina
h.	– horas
H1 ou H1^{pred}	– estrutura em α -hélice da haste de proteína de envelope
H2 ou H2^{pred}	– estrutura em α -hélice da haste de proteína de envelope
H₂O	– água
HCl	– ácido clorídrico
HCV	– vírus da hepatite C
HDV-RZ	– ribozima do vírus da hepatite delta
His	– aminoácido histidina
HSP70	– receptor celular (<i>heat shock protein 70</i>)
HSP90	– receptor celular (<i>heat shock protein 90</i>)
HSV-2	– vírus Herpes Simples-2
i.c.	– intracerebral
IFN	– interferon
IgM	– imunoglobulina do tipo M
Ile	– aminoácido isoleucina
i.p.	– intraperitoneal
IPTG	– <i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
Irf1	– gene <i>interferon regulatory factor 1</i>
ISG	– genes estimulados por interferon
ISG15	– proteína tipo-ubiquitina
JAK1	– quinase do tipo Janus (<i>Janus kinase 1</i>)
JEV	– vírus da encefalite japonesa
Kb	– quilobase
KCl	– cloreto de potássio
kDa	– quilodaltons
KH₂PO₄	– fosfato de potássio monobásico
KUNV	– vírus Kunjin
L	– aminoácido leucina
L15	– meio de cultivo de células de inseto C6/36 – Leibovitz L-15 (Gibco)
LB	– meio de cultivo de bactérias <i>Luria Broth</i>
Leu	– aminoácido leucina

LGTV	– vírus Langat
L-SIGN	– receptor celular
Lys	– aminoácido lisina
μ	– micro
μF	– microfaraday
μg/mL	– microgramas por mililitro
μL	– microlitro
μM	– micromolar
M	– molar
Mg²⁺	– magnésio
MgCl₂	– cloreto de magnésio
mg/mL	– miligramas por mililitro
MHC	– complexo de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
MHV	– vírus da hepatite murina
min.	– minutos
mL	– mililitro
mM	– milimolar
Met	– aminoácido metionina
mock	– controle negativo de infecção
MOI	– multiplicidade de infecção (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	– RNA mensageiro
MTase	– metiltransferase
murGAPDH	– gene de expressão constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>Mus musculus</i>
MVE	– Encefalite de <i>Murray Valley</i>
n	– nano
NaCl	– cloreto de sódio
Na₂HPO₄	– fosfato de sódio dibásico
NBT	– <i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
ng	– nanograma
NK	– células <i>natural killers</i>
nm	– nanômetros

NS	– não-estrutural
NS1	– proteína não-estrutural do vírus da dengue NS1
NS2a	– proteína não-estrutural do vírus da dengue NS2a
NS2b	– proteína não-estrutural do vírus da dengue NS2b
NS3	– proteína não-estrutural do vírus da dengue NS3
NS3hel	– domínio helicase da proteína não-estrutural NS3
NS3pro	– domínio protease da proteína não-estrutural NS3
NS3-209pBAC	– clone infeccioso de dengue 1 pBACDV1 contendo mutação na posição 209 da proteína NS3
NS3-435pBAC	– clone infeccioso de dengue 1 pBACDV1 contendo mutação na posição 435 da proteína NS3
NS3-480pBAC	– clone infeccioso de dengue 1 pBACDV1 contendo mutação na posição 480 da proteína NS3
NS4a	– proteína não-estrutural do vírus da dengue NS4a
NS4b	– proteína não-estrutural do vírus da dengue NS4b
NS5	– proteína não-estrutural do vírus da dengue NS5
nt	– nucleotídeos
N-terminal	– porção amino-terminal
NTP	– nucleosídeo 5'-trifosfatado
NTR	– não traduzida
°C	– grau Celsius
OMS	– Organização Mundial de Saúde
ORF	– quadro aberto de leitura (<i>open reading frame</i>)
P	– aminoácido prolina
PAHO	– <i>Pan American Health Organization</i>
pb	– pares de bases
pBACDV1	– clone infeccioso de dengue 1 (cepa BR/90)
PBS	– phosphate buffered saline
PBMC	– células polimorfonucleares
PCR	– reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	– <i>polyethylene glycol</i>
PF	– peptídeo de fusão
Phe	– aminoácido fenilalanina

pmol/μL	– picomol por microlitro
prM	– proteína de pré-membrana do vírus da dengue
prM/E	– quimera construída com as proteína prM e de envelope
Pro	– aminoácido prolina
Profa	– professora
prom	– promotor
Psmb8	– gene proteosome subunit beta type 8
PUC/PR	– Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Q	– aminoácido glutamina
qPCR	– reação em cadeia da polimerase em tempo real
QRRGRVGR	– sequência de aminoácidos do motivo VI das RNA helicases, glutamina-arginina-arginina-glicina-arginina-valina-glicina-arginina
qRT-PCR	– transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase em tempo real
R	– aminoácido arginina
RdRp	– RNA polimerase dependente de RNA
RE	– retículo endoplasmático
RNA	– ácido ribonucléico
RT-PCR	– transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase
S	– aminoácido serina
SDS	– Sodium Dodecyl Sulfate
seg.	– segundos
SFB	– soro fetal bovino
SL	– estruturas secundárias em forma de grampo de cabelo (hairpin/stem-loop)
SLEV	– vírus da encefalite de Saint Louis
SNC	– sistema nervoso central
(-) ssRNA	– RNA simples fita polaridade negativa
(+) ssRNA	– RNA simples fita polaridade positiva
SVS/MS	– Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
T	– aminoácido treonina
T7	– bacteriófago T7
TB	– meio de cultivo de bactérias Terrific Broth

TBEV	– vírus da encefalite causada por carrapatos
term	– terminador
TGN	– rede trans-Golgi
Thr	– aminoácido treonina
TMEV	– vírus da encefalomielite murina de Theiler
TNE	– tampão para gradiente de sacarose
TNFα	– fator de necrose tumoral alfa (<i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
TO	– cepa de baixa virulência do vírus da encefalomielite murina de Theiler
TOP10	– linhagem comercial bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
TOP10F'	– linhagem comercial bacteriana de <i>Escherichia coli</i>
TPP	– marca das garrafas de cultivo celular
Tyr	– aminoácido tirosina
U/μL	– unidades por microlitro
UAR	– <i>upstream UAG region</i>
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
USP18	– gene <i>ubiquitin specific protease 18</i>
V	– aminoácido valina
V	– volts
v/v	– volume/volume
Val	– aminoácido valina
VLPs	– partículas semelhantes a vírus (<i>virus like particles</i>)
WHO	– <i>World Health Organization</i>
WNV	– vírus da febre do Oeste do Nilo (<i>West Nile virus</i>)
WW	– cepa de baixa virulência do vírus da encefalomielite murina de Theiler
X-Gal	– <i>bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside</i>
xg	– força da gravidade
Y	– aminoácido tirosina
YFV	– vírus da febre amarela (<i>yellow fever virus</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 A dengue.....	27
1.2 A dengue no Brasil.....	28
1.3 O mosquito vetor e o ciclo de transmissão.....	31
1.4 O vírus.....	32
1.4.1 Regiões não-traduzidas.....	34
1.4.2 Proteínas estruturais.....	35
1.4.3 Proteínas não-estruturais.....	37
1.5 Morfogênese viral.....	42
1.6 Patogênese.....	45
1.6.1 Modelo murino no estudo da patogênese da dengue.....	48
1.7 Clones infecciosos e replicons como ferramentas genéticas.....	50
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1 Construção de clones recombinantes.....	55
3.1.1 Amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse.....	55
3.1.2 Clonagem dos fragmentos mutados em vetor pGEM-T Easy.....	57
3.1.3 Preparo de células bacterianas de <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) linhagens TOP10 e TOP10F' cálcio competentes.....	58
3.1.4 Transformação de bactérias cálcio-competente TOP10F' com plasmídeos pGEM-T Easy.....	59
3.1.5 Minipreparação do DNA plasmidial dos clones recombinantes em pGEM-T Easy e sequenciamento.....	60
3.1.6 Minipreparação do genoma infeccioso pBACDV1.....	61
3.1.7 Sub-clonagem em pBACDV1 – clones com mutação única.....	62
3.1.8 Transformação de bactérias cálcio-competente TOP10 com plasmídeos pBACDV1.....	65

3.1.9 Seleção de clones recombinantes pela técnica de PCR de colônia e confirmação por digestão.....	66
3.1.10 Minipreparação dos clones recombinantes pBACDV1-mut e sequenciamento.....	67
3.1.11 Construção de clones recombinantes – duplos e triplo mutantes.....	70
3.2. Geração de vírus recombinantes.....	71
3.2.1 Linearização dos clones recombinantes por digestão.....	71
3.2.2 Transcrição <i>in vitro</i>	72
3.2.3 Determinação da linhagem celular e método de transfecção.....	73
3.2.3.1 Eletroporação.....	73
3.2.3.2 Transfecção por lipossomos.....	74
3.2.4 Transfecção de RNA recombinante em células de inseto C6/36.....	74
3.2.5 Titulação viral por imunodeteção de foco.....	74
3.2.6 Amplificação de estoques virais em cultura de células de inseto.....	75
3.2.7 Purificação viral em gradiente de sacarose.....	76
3.2.8 Sequenciamento completo dos vírus recombinantes.....	77
3.3. Análise <i>in vitro</i> dos vírus recombinantes.....	80
3.3.1 Análise comparativa do efeito citopático dos vírus recombinantes e controles em cultura de células de inseto C6/36.....	80
3.3.2 Imunofluorescência indireta de cultura de células de inseto C6/36 com os vírus recombinantes e controles.....	80
3.4 Análise <i>in vivo</i> dos vírus recombinantes.....	81
3.4.1 Inoculação de camundongos – ensaio de DL50 do genoma infeccioso pBACDV1 e infecção com vírus recombinantes e controles	81
3.4.2 Extração RNA de tecido cerebral infectado com vírus recombinantes e controles.....	83
3.4.3 Avaliação de possível contaminação com vírus da encefalomielite murina de Theiler no sistema nervoso central de camundongos por PCR em tempo real.....	83

3.4.4	Análise da replicação viral dos vírus dengue recombinantes e controles no sistema nervoso central de camundongos por PCR em tempo real.....	84
3.4.5	Análise do perfil da expressão gênica no sistema nervoso central de camundongos infectados com vírus recombinantes e controles por PCR em tempo real.....	85
3.4.6	Análise histopatológica dos vírus recombinantes e controles.....	87
3.5.	Novas mutações NS3-480.....	89
4.	RESULTADOS.....	91
4.1	Localização das mutações no genoma viral.....	91
4.2	Construção de clones recombinantes.....	93
4.3	Geração de vírus recombinantes.....	112
4.3.1	Preparação do DNA dos clones e transcrição <i>in vitro</i>	112
4.3.2	Determinação da linhagem celular e método de transfecção.....	114
4.3.3	Transfecção de RNA recombinante em células de inseto C6/36.....	116
4.3.4	Amplificação de estoques virais em cultura de células de inseto e purificação viral em gradiente de sacarose.....	117
4.4	Caracterização genética completa dos vírus recombinantes.....	118
4.5	Análise comparativa do efeito citopático produzido pelos vírus recombinantes em culturas de células de inseto C6/36.....	123
4.6	Análise comparativa do padrão de infecção dos vírus recombinantes por imunofluorescência indireta em cultura de células de inseto C6/36.....	126
4.7	Ensaio de DL50 para inoculação do genoma infeccioso pBACDV1, vírus recombinantes e controles, em camundongos neonatos.....	128
4.8	Exclusão de possível contaminação com vírus da encefalomielite murina de Theiler no sistema nervoso central de camundongos por PCR em tempo real.....	130
4.9	Análise das taxas de replicação viral dos vírus recombinantes no SNC de camundongos por PCR em tempo real.....	132
4.10	Análise do perfil da expressão gênica no SNC de camundongos infectados com vírus recombinantes por PCR em tempo real.....	133

4.11	Análise histopatológica e imunohistoquímica do tecido cerebral dos camundongos infectados com vírus recombinantes.....	135
4.12	Construção de novos clones contendo aminoácidos de diferentes famílias na posição NS3-480.....	142
5.	DISCUSSÃO.....	148
6.	CONCLUSÕES.....	166
7.	PERSPECTIVAS.....	168
	REFERÊNCIAS.....	169
	APÊNDICES.....	205
	A. ARTIGOS PUBLICADOS.....	205
	ANEXOS.....	232
	A. SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	232
	B. MEIOS DE CULTURA.....	233
	C. LINHAGENS BACTERIANAS DE <i>Escherichia coli</i>	233

1. INTRODUÇÃO

1.1 A dengue

A dengue é a principal arbovirose (doença viral transmitida por artrópodes) tropical transmitida ao homem através de mosquitos fêmeas hematófagos do gênero *Aedes* (HENCHAL; PUTNAK, 1990), e está distribuída por todas as regiões tropicais e sub-tropicais do planeta (Figura 1.1), sendo hoje um dos principais problemas de saúde pública no mundo (GUZMÁN, M.; KOURI, 2003; WHO, 2008). Estima-se que cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco, principalmente no sul e sudeste da Ásia, Américas Central e do Sul e Caribe (WHO, 2009). Além disso, cerca de 80 milhões de pessoas se infectam anualmente e mais de 550 mil necessitam de hospitalização com pelo menos 20 mil casos de morte decorrente da doença (WHO, 2007).

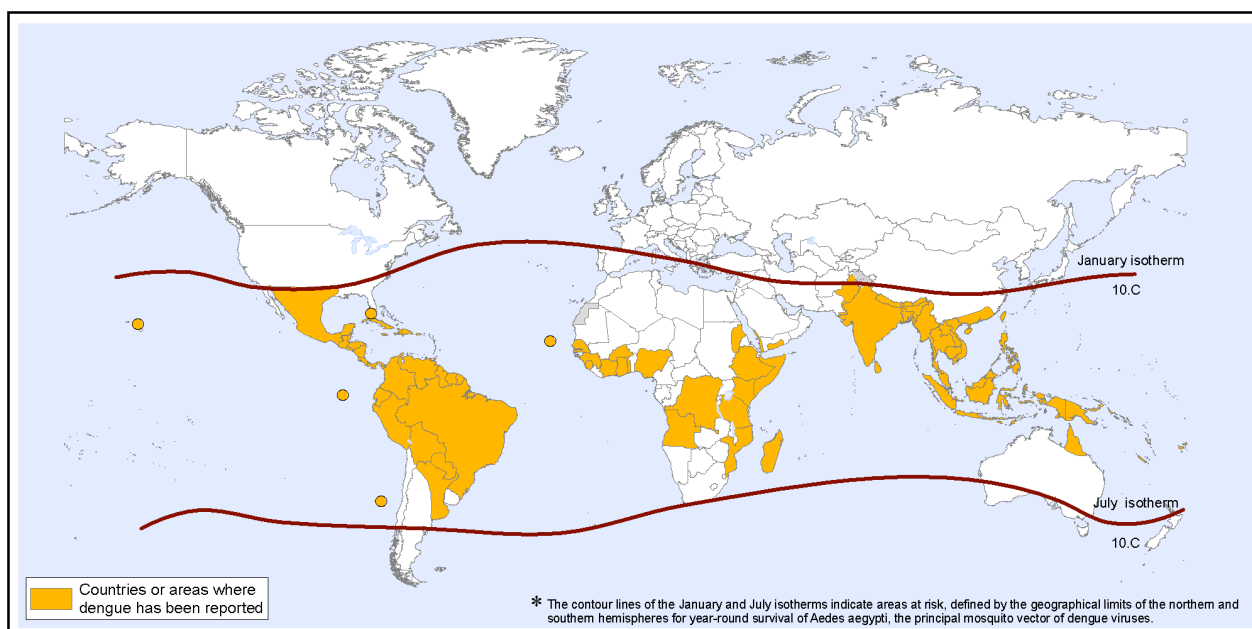


Figura 1.1 – Distribuição mundial das áreas de risco de dengue (laranja) em 2008. * As linhas de contorno das isotermas de janeiro e julho (vermelho) indicam as áreas de risco, definidas pelos limites geográficos dos hemisférios norte e sul para o ciclo de sobrevivência do *Aedes aegypti*, o principal mosquito vetor dos vírus da dengue. (WHO, 2008).

A emergência global da dengue está diretamente ligada à carência de um programa eficiente de combate ao mosquito transmissor em áreas onde a dengue é endêmica. Além disso, o aumento populacional mundial, a rápida urbanização e o crescente número de viagens aéreas internacionais contribuem para a manutenção e aumento de epidemias de dengue no mundo (KYLE; HARRIS, 2008)

Apesar dos esforços das pesquisas (WEBSTER; FARRAR; ROWLAND-JONES, 2009) e da necessidade imediata, não existem vacinas contra a dengue disponíveis para a população, e seu desenvolvimento esbarra em várias limitações. A vacina deve conferir proteção de longa duração contra os quatro sorotipos do vírus, não há um modelo animal adequado capaz de reproduzir as formas graves de dengue (BENTE; RICO-HESSE, 2006) e ainda existe o fenômeno da infecção secundária potencializada pelos anticorpos heterólogos (ADE) (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977). Além disso, existem relatos na literatura sobre a capacidade de recombinação (HOLMES *et al.*, 1999; TOLOU *et al.*, 2001; ABUBAKAR; WONG; CHAN, 2002; CARVALHO *et al.*, 2010) e de interferência viral entre sorotipos (SUN *et al.*, 2006; GUY *et al.*, 2009).

1.2 A dengue no Brasil

No Brasil, a dengue tem sido objeto de uma das maiores campanhas de saúde pública realizadas nos últimos anos (<http://www.combatadengue.com.br>). O mosquito transmissor da doença, o *Aedes aegypti*, que havia sido erradicado de vários países do continente americano nas décadas de 50 e 60, volta a se disseminar na década de 70 e hoje é detectado em praticamente todo território nacional (Figura 1.2). Este fato deve-se a falhas no sistema de vigilância epidemiológica e pelas mudanças sociais e ambientais (GUZMÁN; KOURI, 2003; TAPIA-CONYER; MÉNDEZ-GALVÁN; GALLARDO-RINCÓN, 2009).

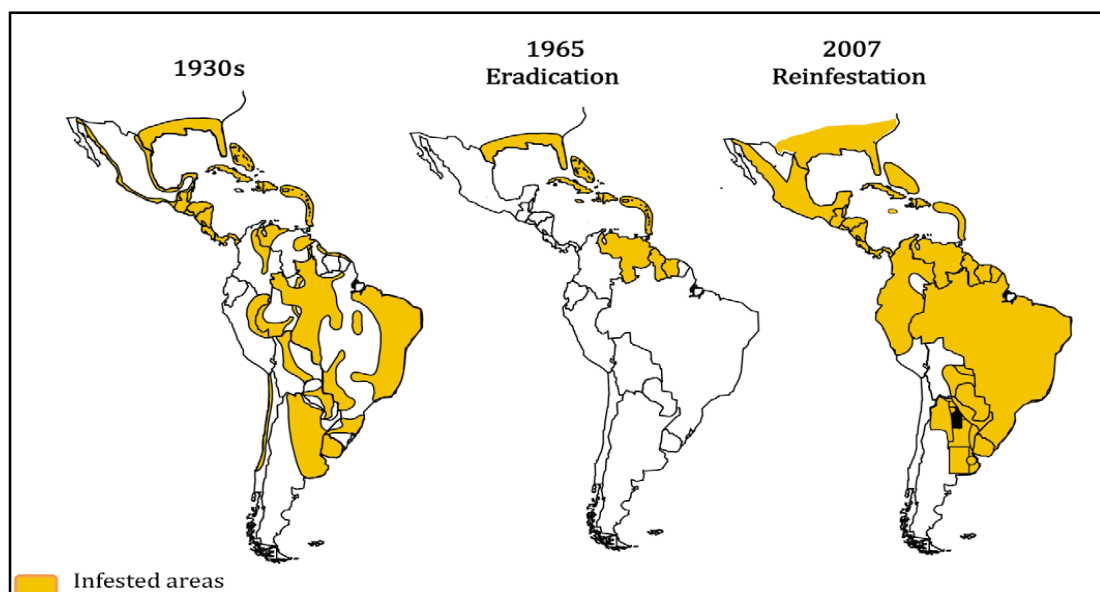


Figura 1.2 – Reinfestação do mosquito *Aedes aegypti* na América Latina e Caribe. Figuras compiladas por PAHO. Áreas infestadas marcadas em amarelo. (TAPIA-CONYER MÉNDEZ-GALVÁN; GALLARDO-RINCÓN, 2009).

Em 1986, após um período de mais de 60 anos sem notificação, o vírus da dengue (sorotipo 1, DENV1) foi detectado no Brasil, inicialmente no estado do Rio de Janeiro, causando uma grande epidemia (SCHATZMAYR *et al.*, 1986). Em 1990, quatro anos após a re-introdução da doença, foi detectado o primeiro caso de dengue causado pelo sorotipo 2 do vírus (DENV2) (NOGUEIRA *et al.*, 1990) e, em 2000, do sorotipo 3 (DENV3) (NOGUEIRA *et al.*, 2001), ambos também no Rio de Janeiro. Com a co-circulação dos três sorotipos ocorreu, em 2002, a mais grave epidemia de dengue no país (Figura 1.3). O sorotipo 4 foi identificado no Brasil por um grupo do Amazonas em amostras coletadas de três pacientes residentes em Manaus, em 2006 (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; DE MELO; ROMANO; ZANOTTO, 2009), porém existem controvérsias com relação a origem desses casos e este dado não é confirmado pelo Ministério da Saúde.

No Brasil, atualmente ocorre a co-circulação de DENV1, DENV2 e DENV3 em todas as regiões do país, sendo que apenas o estado de Santa Catarina não apresentou casos autóctones na última epidemia de 2009 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Atualmente, o Brasil se encontra em uma situação epidemiológica alarmante, e contribui com 80% dos casos de dengue registrados nas Américas (NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2009).

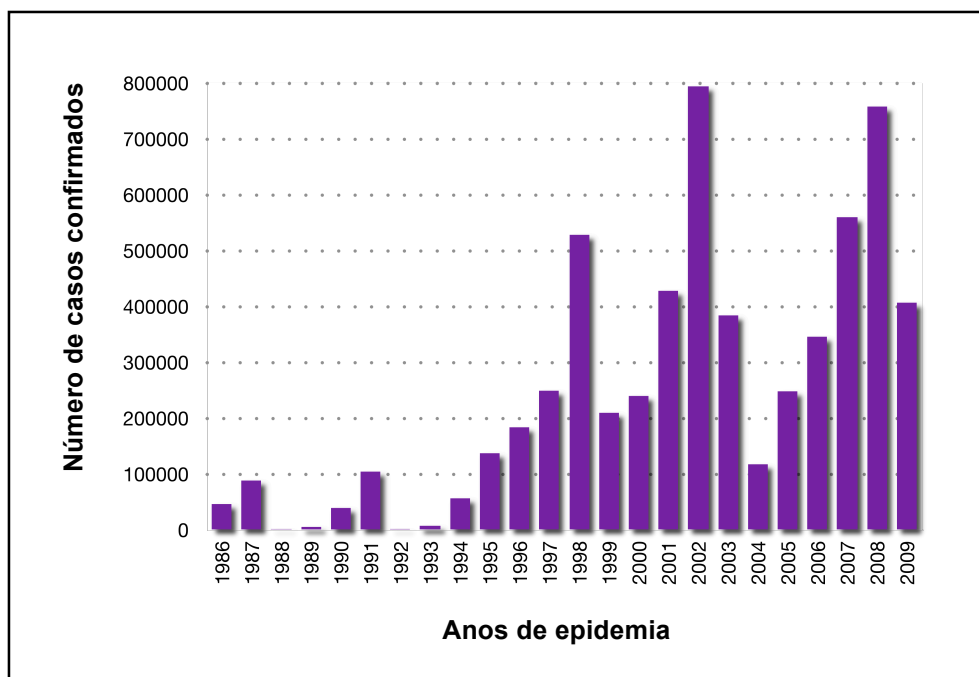


Figura 1.3 – Número de casos de dengue no Brasil de 1986 a 2009. (Dados obtidos do Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde).

De acordo com dados epidemiológicos de 2009 da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), foram confirmados 1.386 casos de febre hemorrágica da dengue (DHF), com 98 óbitos. Também foram confirmados 2.510 casos de dengue com complicação (DCC) com 58 óbitos. Em 2008, no mesmo período, ocorreram 3.660 casos de DHF e 16.569 de DCC, o que mostra uma importante redução de 80,7% no número de casos graves em 2009. Além disso, a análise do monitoramento da circulação viral demonstra o isolamento dos sorotipos DENV1, DENV2 e DENV3, com o predomínio para o sorotipo DENV2, em 50% dos casos de isolamento de 2009 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.3 O mosquito vetor e o ciclo de transmissão

Várias espécies de mosquito do gênero *Aedes* podem agir como vetor para DENV, dependendo da área geográfica e do tipo de ciclo de transmissão, entre elas *A. albopictus*, *A. aegypti* e *A. polynesiensis*, sendo as duas primeiras encontradas em diversas regiões do Brasil e o *A. aegypti*, o principal vetor urbano da dengue (GUBLER, 1998; WEAVER; BARRET, 2004).

Atualmente, o mosquito transmissor é encontrado numa larga faixa do continente americano (GUZMÁN; KOURI, 2003), desde o Uruguai até o sul dos Estados Unidos. Há registro de surtos importantes de dengue em vários países como Venezuela, Cuba, Brasil e Paraguai (SEIJO *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2010).

No Brasil, o mosquito está restrito às vilas e cidades, sempre ligado ao peridomicílio e domicílio humano, e raramente em ambientes semi-silvestres. É pequeno, preto e branco, altamente adaptado ao ambiente doméstico, tem hábito diurno e deposita seus ovos em recipientes contendo água limpa parada (GUBLER, 1998; THOMAS *et al.*, 2003; MALAVIGE *et al.*, 2004; WEAVER; BARRET, 2004).

A infecção pelo vírus da dengue ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*. Após a picada por um mosquito infectado, o vírus inicia, no indivíduo, um período de incubação que leva de 3 a 14 dias, passando a causar sintomas e sinais não-específicos, além de febre (SILER *et al.*, 1926). Durante o período febril, que varia de 2 a 10 dias, as partículas virais circulam no sangue periférico (GUBLER *et al.*, 1981) podendo assim ser transmitidas caso um mosquito venha a picar a pessoa doente. Os mosquitos então se tornam infectados e, após um período de incubação de 8 a 12 dias, denominado período de incubação extrínseca, passam a transmitir o vírus (GUBLER, 1998; THOMAS *et al.*, 2003).

1.4 O vírus

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* (CALISHER, 1988), uma grande família de patógenos virais responsáveis por inúmeras doenças e mortalidade em humanos e animais. O nome *Flavivirus* tem origem do latim, onde “flavus” significa amarelo, relacionando à icterícia causada pela febre amarela (YFV). Este gênero compreende mais de 70 vírus, incluindo, além da dengue e febre amarela, os vírus da encefalite japonesa (JEV), encefalite causada por carrapatos (TBEV), febre do oeste do Nilo (WNV) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005), entre outros. O DENV pode ser classificado em quatro sorotipos distintos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, que embora epidemiologicamente semelhantes, são geneticamente e antigenicamente distintos, e a infecção por qualquer um dos quatro causa manifestações clínicas similares (CALISHER *et al.*, 1989).

O virion maduro é uma partícula esférica com diâmetro entre 40 e 60 nm, e é composto por uma única molécula de RNA de fita simples com polaridade positiva, empacotada pela proteína viral de capsídeo (C) e uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira. Esta camada é envolta por 180 cópias das glicoproteínas de envelope (E) (KUHN *et al.*, 2002) e de membrana (M), que estão ancoradas na membrana lipídica por seus domínios C-terminal (LINDENBACH; RICE, 2001; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005) (Figura 1.4).

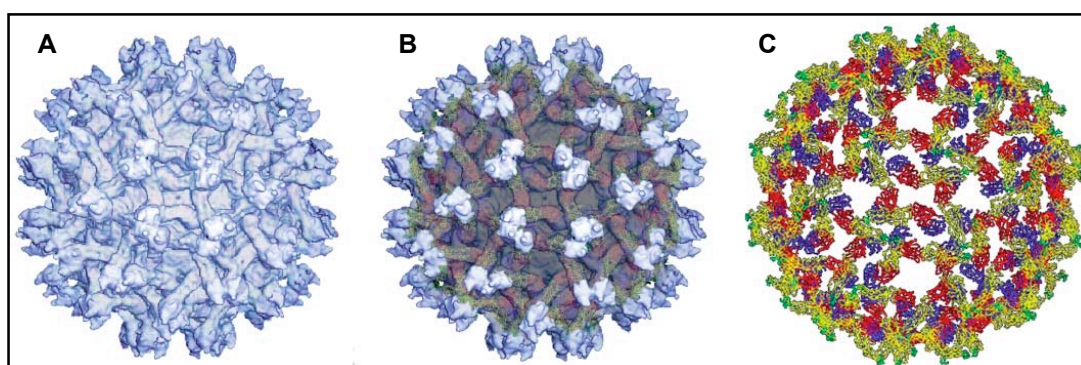


Figura 1.4 – Representação de partículas de *Flavivirus* imaturas. **A** – Reconstrução da estrutura sombreada de crio-microscopia eletrônica (*cryoEM*) de uma partícula imatura de DENV2 numa resolução de 16Å. **B** – Superposição da proteína E em cima da densidade *cryoEM*. A proteína prM que cobre o trimero é visível. **C** – Organização da proteína E na partícula imatura. (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

O genoma viral contém aproximadamente 11.000 nucleotídeos (nt) e possui uma única fase de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína, que é flanqueada por duas regiões não traduzidas (NTR) (Figura 1.5) (CHAMBERS *et al.*, 1990; RICE, 1996), que parecem ser responsáveis por conferir estabilidade ao RNA viral, além de desempenharem um papel importante na regulação da síntese de moléculas de RNA e na expressão das proteínas virais (KHRROMYKH *et al.*, 2001; ALVAREZ *et al.*, 2005a; CHIU; KINNEY; DREHER, 2005), e que provavelmente interagem com fatores celulares envolvidos nestas funções. O RNA genômico possui um *cap* na região 5'NTR e não apresenta cauda poli(A) na região 3'NTR. O *cap* desempenha um papel importante atuando no início do processo de tradução e protegendo o RNA viral de degradação por exonucelases (BOLLATI *et al.*, 2009). A tradução da ORF resulta em uma única poliproteína precursora, de aproximadamente 3.390 aminoácidos (aa), que é clivada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e derivadas do hospedeiro, gerando um conjunto de três proteínas estruturais (C, prM e E), e de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (CHAMBERS *et al.*, 1990; RICE, 1996; MURRAY; JONES; RICE, 2008) (Figura 1.5).

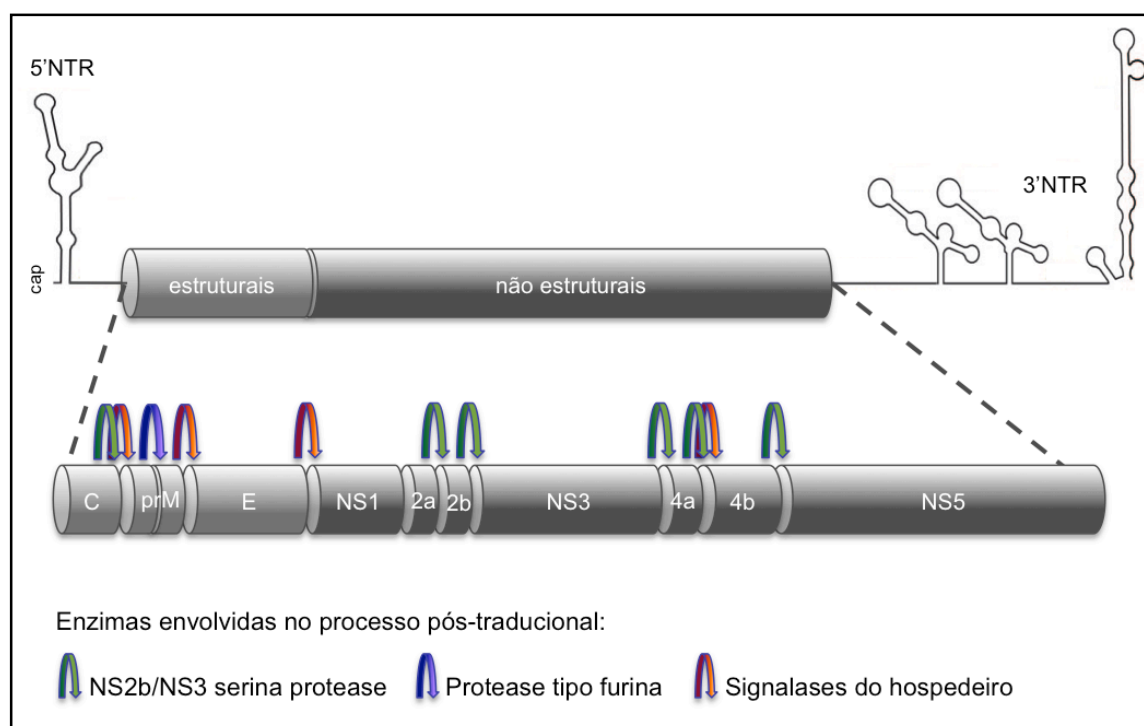


Figura 1.5 – Representação esquemática da organização do genoma do vírus da dengue e clivagem da poliproteína em três proteínas estruturais e sete não-estruturais por proteases viral e do hospedeiro.

1.4.1 Regiões não-traduzidas

As regiões 5' e 3'NTR apresentam sequências conservadas (*conserved sequences*, CSs) que parecem desempenhar papéis importantes no processo de replicação do genoma viral (HAHN *et al.*, 1987; KHRONYKH *et al.*, 2001; ALVAREZ *et al.*, 2005a; VILLORDO; GAMARNIK, 2009). O fragmento 5'CS, localizado na região que codifica a porção N-terminal da proteína C, é complementar a 3'CS, situado no 3'NTR. A região 5'UAR, localizada antes do AUG que codifica o primeiro aminoácido da poliproteína, é complementar a 3'UAR, situada no 3'SL (*stem-loop*) (Figura 1.6) (ALVAREZ *et al.*, 2005a; VILLORDO; GAMARNIK, 2009). Tem sido descrito que essa complementaridade é essencial para a replicação viral em cultura celular (BREDENBEEK *et al.*, 2003; LO *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2005a, ALVAREZ *et al.*, 2005b), o que corrobora com a hipótese de que a circularização do RNA é necessária para o sucesso do ciclo replicativo (KHRONYKH *et al.*, 2001).

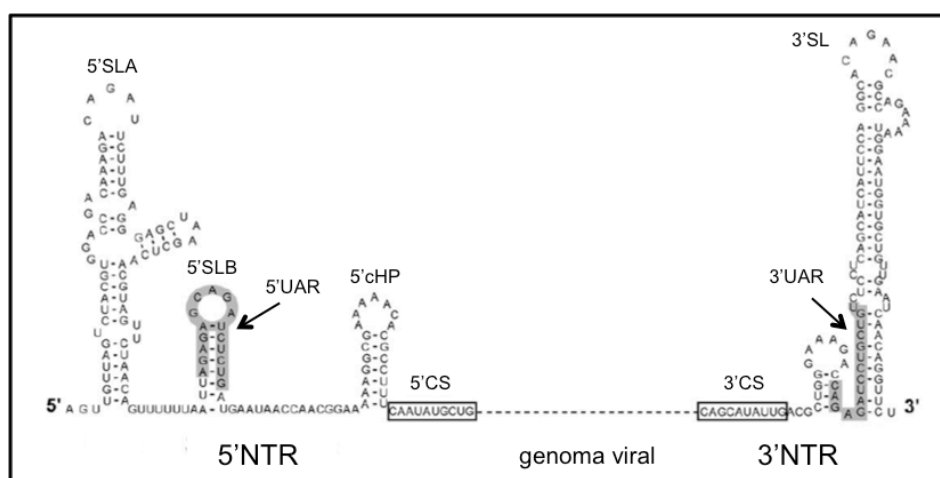


Figura 1.6 – Representação de uma porção das sequências e predição das estruturas secundárias das regiões 5'NTR e 3'NTR, indicando seus elementos: 5'SLA (5' *stem-loop* A), 5'SLB (5' *stem-loop* B), 5'cHP (5' *capsid region hairpin*) e 3'SL (3' *stem-loop*). A linha pontilhada representa o genoma viral. (Modificado de VILLORDO; GAMARNIK; 2009).

1.4.2 Proteínas estruturais

A proteína do capsídeo (C), responsável pela forma estrutural da partícula viral, possui caráter básico e sua região C-terminal pode estar envolvida na associação ao RNA viral (MA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2002). Sugere-se que esta associação forme um complexo evitando o contato do RNA com a proteína de envelope (MURRAY; JONES; RICE, 2008). Apesar do processo de recrutamento de partículas de RNA e proteínas C para a formação do nucleocapsídeo não ser muito bem compreendida, a interação entre a proteína e o RNA parece ser crucial para a produção de partículas virais viáveis (JONES *et al.*, 2003).

A proteína glicosilada prM faz parte da estrutura dos virions imaturos e é clivada por uma protease tipo furina como última etapa antes da liberação da partícula infecciosa da célula, protegendo a proteína fusogênica de envelope durante seu trânsito pelos compartimentos ácidos da via secretória (MURRAY; JONES; RICE, 2008). Esta clivagem gera a proteína estrutural M, que juntamente com E formam a estrutura externa da partícula viral madura (CHAMBERS *et al.*, 1990; RICE, 1996; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

A proteína de envelope (E) é uma proteína de fusão da classe II (KIELIAN, 2006), sendo responsável pelas principais propriedades biológicas do vírus. Além de ser o principal componente antigênico da superfície do virion (GROMOWSKI; BARRETT, 2007), age como hemaglutinina viral, apresenta capacidade fusogênica com membranas da célula hospedeira (STIASNY *et al.*, 2009), induz resposta imune protetora (WAHALA *et al.*, 2009) e interage com receptores na superfície de células alvo (CHEN; MAGUIRE; MARKS, 1996; HUERTA *et al.*, 2008). A proteína E possui dois sítios de N-glicosilação, nas posições Asn-67 e Asn-153, sendo a glicosilação no sítio Asn-153 conservada na maioria dos *Flavivirus* e Asn-67 exclusiva dos vírus dengue (HEINZ; ALLISON, 2003; BRYANT *et al.*, 2007; MONDOTE *et al.*, 2007). Evidências indicam que a proteína E desempenha um papel na patogenicidade de diversos flavivírus, não apenas pela definição do tropismo celular como também afetando a penetração do vírus (GOLLINS; PORTERFIELD, 1986; REY *et al.*, 1995). A estrutura cristalográfica da proteína E já foi descrita para os *Flavivirus* DENV1, DENV2, DENV3, TBEV e WNV (NAYAK *et al.*, 2009; BRESSANELLI *et al.*, 2004; MODIS *et al.*, 2003; 2004; 2005; REY *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2004; KANAI *et al.*,

2006; NYBAKKEN *et al.*, 2006), o que possibilitou a obtenção de informações com relação à disposição espacial das proteínas de superfície, sua função e os mecanismos de fusão. O monômero nativo da proteína E é formado por três domínios distintos: I, II e III. O domínio I é formado por 8 fitas de β -barril contendo 2 inserções em *loop* e 2 α -hélices que funcionam como uma dobradiça para a reorganização da proteína E em meio de pH baixo. O domínio II contém o peptídeo de fusão (PF – aa 98–111), uma região altamente conservada entre os *Flavivirus*. O PF reage com anticorpos monoclonais que possuem reação cruzada entre *Flavivirus* e com inibidores da fusão de membranas. É responsável pelo início do processo de fusão entre as membranas do *virion* e do endossomo. O domínio III é formado por 10 fitas de β -barril tipo-imunoglobulina, com motivos putativos de ligação de receptor celular e elícita altos títulos de anticorpos neutralizantes específicos (HUANG *et al.*, 2010). A região logo abaixo do domínio III representa a porção C-terminal, que é formada por uma haste e uma âncora transmembrana (Figura 1.7), e que corresponde a 20% da proteína E, para a qual apenas estruturas preditas, baseadas em sequências nucleotídicas, estão disponíveis. A haste é composta por duas estruturas em α -hélice chamadas H1^{pred} (aa 401–413) e H2^{pred} (aa 431–449) que são separadas por um elemento CS (aa 414–430). Na âncora transmembrana estão os segmentos TM1 (aa 450–471) e TM2 (aa 473–496). H2^{pred} é contíguo ao TM1 e juntos constituem uma α -hélice contínua que se estende até a membrana viral. TM2, que possui função de sequência sinal para a proteína NS1, foi também descrito cruzando a membrana viral, mas não se sabe ao certo se realmente permanece embebida na membrana após a clivagem por sinalases, que separa E e NS1 durante o processamento da poliproteína viral (ALLISON *et al.*, 1999).

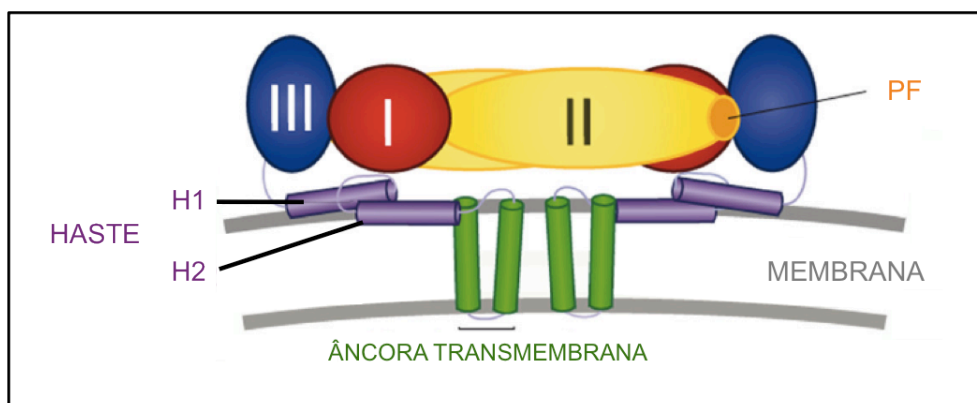


Figura 1.7 – Representação esquemática da vista lateral de um homodímero da proteína E e seus elementos: domínios I em vermelho, domínio II em amarelo, domínio III em azul, peptídeo de fusão (PF) em laranja, haste em roxo e âncora transmembrana em verde, além da membrana viral em cinza (modificado de KIERMAYR; STIASNY; HEINZ, 2009).

1.4.3 Proteínas não-estruturais

As proteínas não-estruturais são essenciais para a replicação do RNA viral, estando envolvidas no complexo de replicação viral (CR) (BOLLATI *et al.*, 2009). A glicoproteína não-estrutural NS1 pode ser detectada em células de vertebrados, intracelularmente, associada a superfície celular ou secretada no meio extracelular sob a forma hexamérica (WINKLER *et al.*, 1988; 1989; FLAMAND *et al.*, 1999) e também no soro de pacientes infectados com o vírus (LIBRATY *et al.*, 2002; RAMIREZ *et al.*, 2009). Os níveis dessa proteína circulante no soro de pacientes infectados têm sido correlacionados com a gravidade da doença (AVIRUTNAN *et al.*, 2006). Tanto as formas solúveis da proteína NS1 ou associadas à superfície celular podem desempenhar um importante papel na patogênese da dengue (LIBRATY *et al.*, 2002; ALCON-LEPODER *et al.*, 2005), provocando a formação auto-anticorpos que reagem com plaquetas e proteínas da matriz extracelular induzindo disfunção plaquetária e hemorragia (FALCONAR, 1997; CHANG *et al.* 2002, 2009; SUN *et al.*, 2007), pode diretamente reforçar a infecção (ALCON-LEPODER *et al.*, 2005), ou ainda promover a formação do complexo terminal do complemento (KUROSU *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que a proteína NS1 foi identificada sendo um determinante grupo e sorotipo-específicos, e marcador de diagnóstico precoce (FALCONAR; YOUNG, 1991; HENCHAL *et al.*, 1987; SHU *et al.*, 2000). Além disso,

foi demonstrado que a NS1 de flavivírus desempenha um papel essencial no processo de replicação viral (MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; MUYLELAERT; GALLER; RICE, 1997; LINDENBACH; RICE, 1997), porém, sua função direta ainda não é conhecida. Entretanto, foi comprovado que o sítio de glicosilação, localizado na posição 130 da proteína NS1, é necessário para replicação viral (TAJIMA; TAKASAKI; KURANE, 2008).

A proteína NS3 está envolvida no processamento da poliproteína e na replicação do genoma viral. É uma proteína multifuncional com no mínimo três atividades distintas (ASSENBERG *et al.*, 2009). A região N-terminal (180 resíduos de aminoácidos – NS3pro), tendo como co-fator o domínio hidrofóbico da proteína NS2B, apresenta atividade de serina-protease, catalisando as clivagens de várias proteínas virais (CHEN *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1997; CUI *et al.*, 1998; KHROMYKH *et al.*, 1999a, 1999b; LINDENBACH; RICE, 2003). Os dois terços finais da proteína NS3 (região C-terminal) apresentam homologia com a família das RNA helicases (GORBALENYA *et al.*, 1989; XU *et al.*, 2005; SAMPATH *et al.*, 2006). Além disso, também possui atividade de RNA trifosfatase, que promove a desfosforilação da região 5'NTR para a adição do *cap* (WENGLER; WENGLER, 1991; KHROMYKH *et al.*, 1999a, 1999b, LINDENBACH; RICE, 2003). O fragmento correspondente aos resíduos de aminoácido 180 a 618 da NS3 de DENV compreende dois motivos chamados *Walker A* GK(S/T) e *Walker B* DEx(D/H). Estes motivos estão presentes em uma vasta família de proteínas ligadoras de nucleotídeos que participam de uma grande variedade de funções celulares como hidrólise de nucleosídeos 5'-trifosfatados (NTP) com movimento direcional, desestabilização de fitas duplas de ácido nucléico, processamento de RNA, além de recombinação e reparo de DNA (SINGLETON; WIGLEY, 2002). As helicases são enzimas motoras que utilizam a energia derivada da hidrólise de NTP para catalisar o desenovelamento e remodelamento de fitas duplas de ácido nucléico, e são classificadas em 3 grandes superfamílias, baseado na comparação de sequências e motivos conservados. Além disso, as helicases ainda podem ser classificadas nas subfamílias DEAD, DExD e DExx, dependendo da sequência do motivo II (SCHMID; LINDER, 1992). As helicases se ligam a NTP por dois elementos estruturais, o motivo I ou *Walker A*, que é um *loop* de ligação a fosfato, e o motivo II ou *Walker B*, que é um *loop* de ácido aspártico de ligação a Mg^{2+} (KOONIN, 1991). A presença dos motivos *Walker A* e *Walker B* e de outros cinco motivos conservados, classifica a helicase de DENV

dentro da superfamília 2 das RNA helicases/NTPases (UTAMA *et al.*, 2000a). A superfamília 2 das RNA helicases, também chamada helicases DEAD(D/H)-box, possui sete motivos conservados, que sugerem estar associados à hidrólise de NTP e ligação à ácidos nucleicos (YAMASHITA *et al.*, 2008). A helicase de DENV é formada por três subdomínios com tamanhos aproximadamente iguais formando, na sua junção, uma grande fissura positivamente carregada, onde se encontra o sítio de ligação ao RNA (ASSENBERG *et al.*, 2009). Os sete motivos conservados da superfamília 2 estão localizados nos subdomínios 1 e 2 (Figura 1.8). O subdomínio 1 é composto por quatro α -hélices e cinco folhas- β , e possui os motivos *Walker A* (motivo I, GSGKT) e *Walker B* (motivo II, DEAH). O subdomínio 2 é composto por três α -hélices e oito fitas- β e é dividido em duas subunidades. Uma subunidade é cercada por seis fitas- β e três α -hélices, enquanto a outra subunidade possui duas fitas- β penetrando no domínio 3. Acredita-se que o “dedo de arginina” no motivo VI (QRRGRVGR) no subdomínio 2 seja crucial para a hidrólise de NTP (AHMADIAN *et al.*, 1997). O subdomínio 3 é composto de sete α -hélices e duas fitas- β (YAMASHITA *et al.*, 2008). As atividades helicase e NTPase da proteína NS3 já foram caracterizadas funcionalmente para diversos membros da família *Flaviviridae*, como o vírus da hepatite C (HCV), DENV, WNV, YFV e JEV (WARRENER; TAMURA; COLLETT, 1993; GWACK *et al.*, 1996; BOROWSKI *et al.*, 2001; UTAMA *et al.*, 2000b; BENARROCH *et al.*, 2004), e a estrutura cristalográfica do domínio helicase já foi descrita para os *Flavivirus* DENV, YFV, JEV, KUNV (XU *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2005; MASTRANGELO *et al.*, 2007; YAMASHITA *et al.*, 2008).

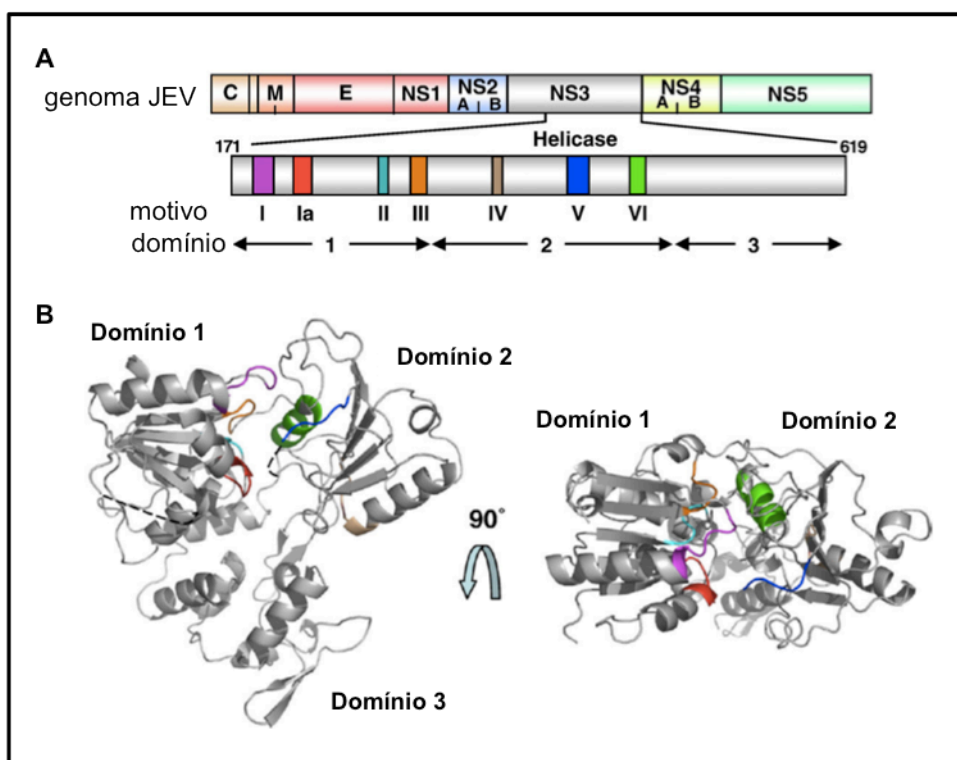


Figura 1.8 – Representação esquemática do genoma e estrutura tri-dimensional do domínio helicase da proteína NS3 de JEV. **A** – Estrutura do genoma de JEV com destaque para os sete motivos conservados do domínio helicase. **B** – Diagrama em fita do domínio helicase de JEV mostrando os domínios 1 e 2 no topo e o domínio 3 na parte inferior em vista lateral (esquerda) e vista superior (direita). Os sete motivos estão representados por cores distintas: motivo I, roxo; motivo Ia, vermelho; motivo II, ciano; motivo III, laranja; motivo IV, rosa; motivo V, azul e motivo VI, verde. (modificado de YAMASHITA *et al.*, 2008)

A maior das proteínas não estruturais (NS5) apresenta sequências conservadas entre os membros do gênero *Flavivirus*, e possui dois domínios caracterizados. A região N-terminal da proteína apresenta atividade de metiltransferase (MTase), que está associada com a reação de adição do *cap* ao RNA (KOONIN, 1993; LINDENBACH; RICE, 2003). A região C-terminal apresenta motivos de atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (replicase viral) (KAMER; ARGOS, 1984; CHAMBERS *et al.*, 1990; BRUENN, 2003). A estrutura cristalográfica da MTase já foi determinada para DENV (EGLOFF *et al.*, 2002), WNV (ZHOU *et al.*, 2007) e YFV (GEISS *et al.*, 2009), além de outros flavivírus transmitidos por carrapatos (BOLLATI *et al.*, 2009). Enquanto apenas duas estruturas de RdRp de flavivírus são conhecidas, KUNV (MALET *et al.*, 2007) e DENV3 (YAP *et al.*, 2007). Ambas estruturas de RdRp adotam a estrutura típica de “mão direita”, compreendendo três domínios, denominados dedos, palma e polegar (MALET *et al.*, 2008). A região entre os resíduos de aminoácidos 320 a 368 é

extremamente conservada entre os flavivírus e está implicada na interação com a proteína NS3 (KAPOOR *et al.*, 1995a; JOHANSSON *et al.*, 2001). Nas infecções por DENV, a proteína NS5 foi localizada dentro do núcleo, entretanto, isso não é comum entre todos os flavivírus. A explicação para esta localização nuclear, uma vez que a função enzimática da RdRp no ciclo de vida do vírus é requerida no citoplasma de célula, é desconhecida, mas está sendo investigada (PRYOR *et al.*, 2007). No entanto, estas observações sugerem que, além de suas funções enzimáticas, a NS5 também pode participar em interações vírus-hospedeiro, interagindo ativamente com o hospedeiro (PERERA; KUHN, 2008).

A proteína NS2B age como co-fator da NS3pro, sendo esta interação responsável pelos eventos de clivagem e maturação da poliproteína viral (CHAMBERS *et al.*, 1990; FALGOUT *et al.*, 1991; LIN *et al.*, 1993). Não se tem evidências diretas sobre a função das proteínas NS2A, NS4A e NS4B. No entanto, estudos sugerem que a proteína NS4A está ancorada à membrana do retículo e interage com as proteínas NS1, NS3 e NS5 (WESTAWAY; MACKENZIE; KHROMYKH, 2003). Outros estudos demonstram que durante a replicação viral, a proteína NS4B pode estar localizada no núcleo da célula hospedeira, e sua interação com a NS3 pode modular a replicação viral, porém seu papel específico ainda não foi determinado (LINDENBACH; RICE, 2003; UMAREDDY *et al.*, 2006). Foi demonstrada a presença da proteína NS2A e possivelmente NS4A associadas a frações da membrana do retículo endoplasmático, confirmando a presença de múltiplos domínios hidrofóbicos observados anteriormente (RICE *et al.*, 1986; MANDL *et al.*, 1989; CHU; WESTAWAY, 1992; KAPOOR *et al.*, 1995a; RICE, 1996; CHEN *et al.*, 1997; CUI *et al.*, 1998; KHROMYKH *et al.*, 1999a, 1999b). Resultados recentes sugerem que a proteína NS2A interage com a região 3'NTR (LINDENBACH; RICE, 2003), e que serve como ponte para a interação das proteínas NS5 e NS4A. Além disso, a NS2A é necessária para a clivagem proteolítica da região C-terminal da NS1 (FALGOUT; CHANOCK; LAI, 1989). Recentemente, foi demonstrado que a NS4B e, com menor importância, a NS2A e NS4A são capazes de bloquear a via de interferon (IFN) (MUÑOZ-JORDAN *et al.*, 2003, 2005; LIU *et al.*, 2004). As funções específicas de cada uma destas proteínas estão sendo determinadas e estudos utilizando a tecnologia de replicons e genomas infecciosos têm demonstrado que elas estão envolvidas na formação e manutenção do CR viral (KHROMYKH *et al.*, 1999a, 1999b; LINDENBACH; RICE, 2003).

1.5 Morfogênese viral

A superfície da partícula viral madura de DENV é revestida por uma armação de 90 cópias da proteína E, organizadas em homodímeros (KUHN *et al.*, 2002; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005), sendo responsável pela interação entre o vírus e a célula hospedeira. A entrada do vírus na célula alvo acontece por endocitose mediada pela interação com receptores, porém as proteínas de superfície celular que estariam envolvidas neste processo ainda não foram totalmente definidas. Muitos estudos têm sido realizados visando caracterizar os receptores celulares envolvidos na penetração do DENV nas células hospedeiras, e no caso de células de vertebrados, vários receptores têm sido propostos, como heparan sulfato, proteínas de choque térmico 70 (*heat shock protein 70*, HSP70) e 90 (*heat shock protein 90*, HSP90), GRP78/BiP, CD14, receptor de 37/67-kDa de alta afinidade pela laminina, L-SIGN e DC-SIGN (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006), sendo este último o melhor caracterizado (SAKUNTABHAI *et al.*, 2005; LOZACH *et al.*, 2005; KWAN *et al.*, 2005; 2008). DC-SIGN são receptores transmembrana tipo-C (dependente de cálcio), compostos por quatro domínios, um citoplasmático, um transmembrana, um envolvendo sete a oito prolongamentos extracelulares e um domínio de reconhecimento de carboidrato. Estes receptores são principalmente expressos em células dendríticas e macrófagos alveolares (ALEN *et al.*, 2009). O DC-SIGN é capaz de mediar a infecção dos quatro sorotipos do DENV, e a sua expressão ectópica confere permissividade à infecção pelo DENV em linhagens celulares normalmente não permissivas (NAVARRO-SÁNCHEZ *et al.*, 2003; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003).

Uma vez internalizada no endossomo, a partícula viral encontra um ambiente ácido, o que desencadeia um rearranjo conformacional na proteína E, onde ocorre a dissociação de seus dímeros e a re-associação irreversível em trímeros, expondo o peptídeo de fusão (PF) (MODIS *et al.*, 2004) (Figuras 1.9a-c). Na conformação pré-fusão, o *loop* interno do PF está localizado na ponta do domínio II da subunidade monomérica e está escondido no bolso hidrofóbico formado pela interação dos domínios I e III da subunidade adjacente (Figura 1.9a). Para o início da fusão, o PF precisa ser liberado desta interação permitindo sua associação com a membrana do endossomo. Este passo inicial é então seguido pela trimerização e

realocação do domínio III (STIASNY *et al.*, 2009). O rearranjo sofrido pela proteína E gera energia necessária capaz de dobrar a membrana da célula em direção à membrana do vírus, induzindo a fusão das membranas (MODIS *et al.*, 2004). Este processo se dá pela inserção do peptídeo de fusão na parte externa da bicamada da membrana celular (Figura 1.9b-c), seguido do dobramento da proteína E, direcionando a região C-terminal da âncora em direção ao peptídeo de fusão (Figura 1.9c-d). Este dobramento força a membrana da célula (ligada pelo peptídeo de fusão) contra a membrana viral (ligada pela região C-terminal da âncora transmembrana), resultando na fusão das duas membranas (Figura 1.9e) (NAYAK *et al.*, 2009). O processo de fusão é crítico para a entrada do vírus e liberação do genoma viral no citoplasma da célula, onde ocorre a tradução e replicação simultânea do RNA viral.

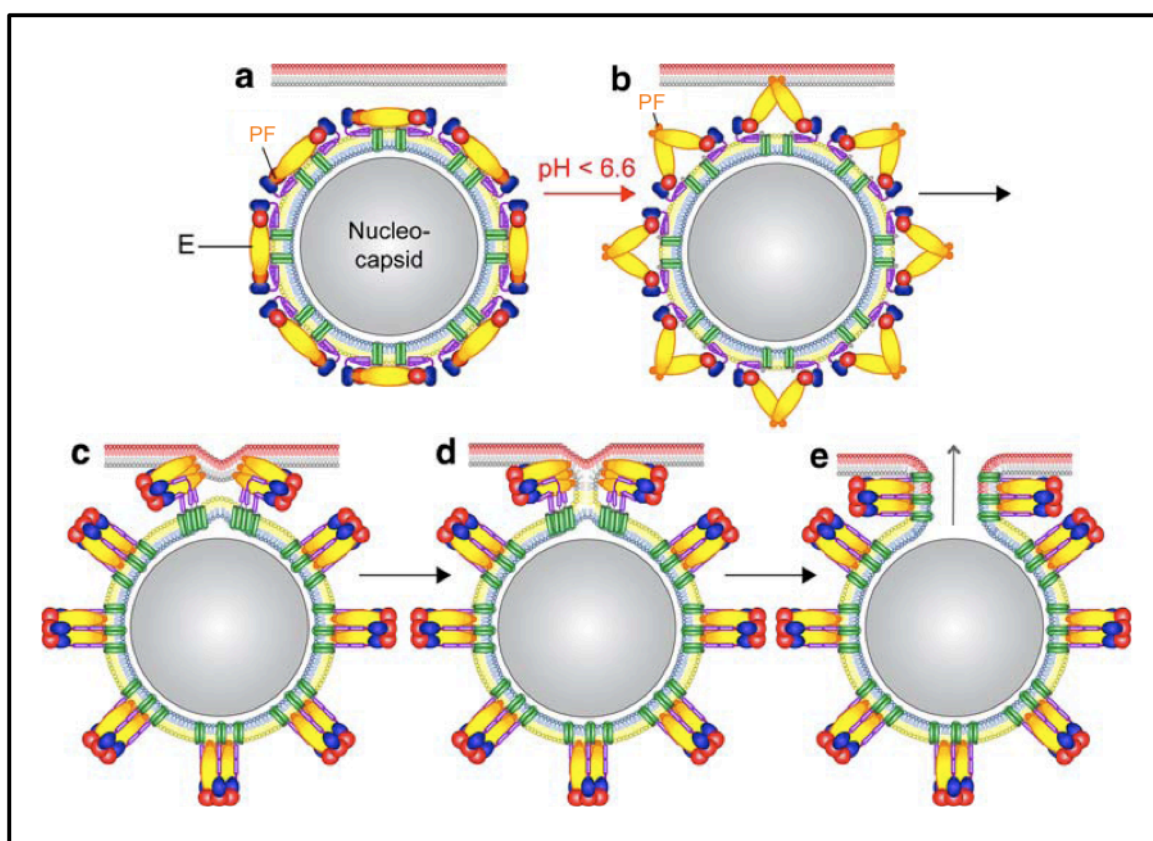


Figura 1.9 – Representação gráfica do mecanismo de fusão mediado por proteínas virais de fusão da classe II. Os domínios e estruturas da proteína E estão representados como na Figura 1.7. **(a)** Estrutura da partícula viral pré-fusão, proteína E organizada em homodímeros; **(b)** O pH ácido do endossomo induz a dissociação dos dímeros em monômeros expondo o peptídeo de fusão (PF) e permitindo sua interação com a membrana do endossomo; **(c)** A inserção do PF na membrana da célula hospedeira promove a formação do trímero; **(d)** Os trímeros se unem e o domínio III é deslocado para promover um dobramento da proteína da porção C-terminal em direção ao peptídeo de fusão, promovendo uma hemi-fusão; **(e)** Formação de poros de fusão. (Modificado de STIASNY *et al.*, 2009)

Uma vez no citoplasma da célula, ocorre a tradução do RNA viral associada ao retículo endoplasmático (RE), seguida do processo de replicação do RNA viral. A replicação é semiconservativa, aonde o RNA de polaridade positiva (que atua como um RNA mensageiro) serve como molde para a síntese de moléculas de RNA de polaridade negativa, que servirão de molde para geração de novas cadeias de RNA de polaridade positiva, e também para a tradução das proteínas virais (WESTAWAY, 1987).

Durante o processo de tradução, as proteínas virais NS são clivadas, por proteases virais do tipo serina e por sinalases da célula hospedeira, e estão envolvidas no processo de replicação do RNA viral. A proteína NS5, que é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), associa-se a proteína NS3 (BOOKS *et al.*, 2002) e a outras proteínas virais para formar o complexo de replicação.

A montagem das partículas imaturas é realizada na superfície do RE quando as proteínas estruturais e as fitas de RNA recém sintetizadas brotam no lúmen do RE. As partículas não-infecciosas, virais imaturas e sub-virais resultantes são transportadas através da rede trans-Golgi (TGN), onde ocorre a glicosilação das proteínas prM, E e NS1. Apesar da biossíntese e montagem da proteína E ocorrer nas membranas do RE, pouco se sabe sobre a interação de chaperonas do RE no processo de dobramento e montagem desta proteína. Algumas proteínas estão sendo investigadas quanto ao seu papel neste processamento, e a imunoglobulina de cadeia pesada ligadora de proteína, calnexina e calreticulina parecem ser essenciais para produção viral (LIMJINDAPORN *et al.*, 2009). As partículas imaturas do *virion* sofrem uma clivagem tardia pela protease tipo furina do hospedeiro (clivagem da glicoproteína prM para gerar a proteína M), resultando em partículas maduras e infecciosas. Esta maturação é necessária para manter a conformação da proteína E, sem expor o PF, durante o transporte pelas cisternas da TGN, que apresentam um pH ácido, e assim, manter o potencial de infectividade dos vírus (HEINZ *et al.*, 1994; HEINZ; ALLISON, 2003; LI *et al.*, 2008). Posteriormente, as partículas infecciosas resultantes são liberadas para o meio extracelular pelo mecanismo de exocitose (Figura 1.10) (CHAMBERS *et al.*, 1990; RICE, 1996; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

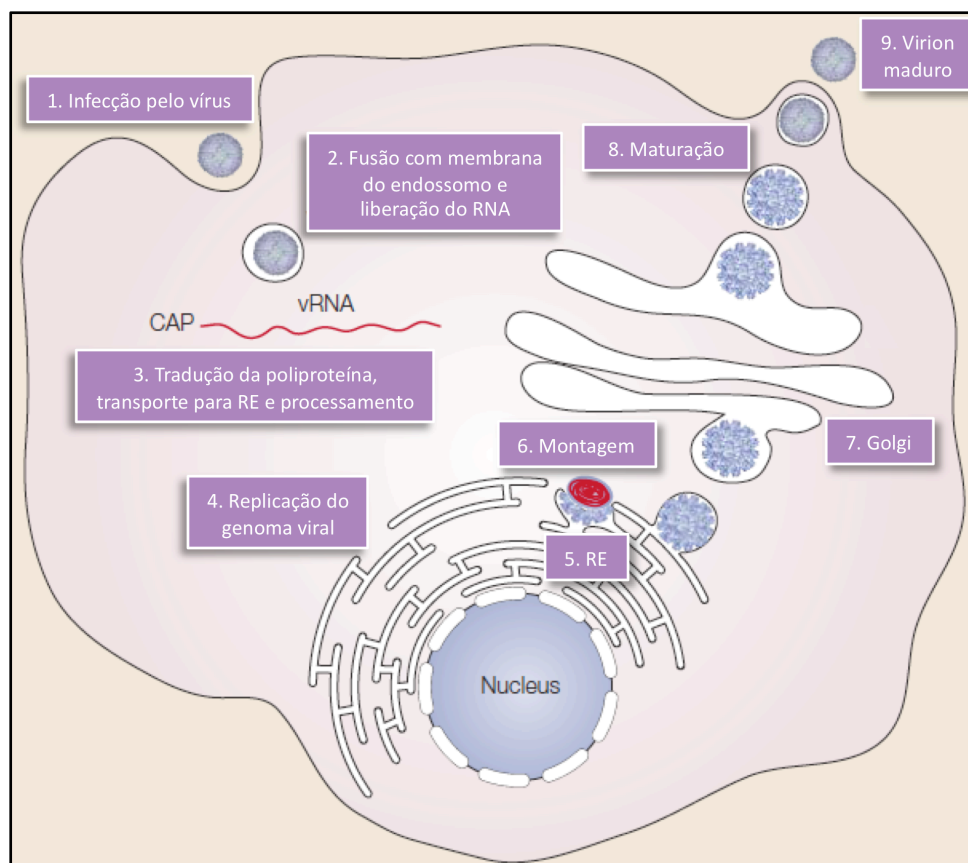


Figura 1.10 – Esquema da morfogênese do vírus da dengue. (Modificado de MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005)

1.6 Patogênese

Os quatro sorotipos de DENV podem ser responsáveis por estados assintomáticos da doença, febres indiferenciadas e até febres hemorrágicas mortais. Até o momento, não foi possível associar um sorotipo ou uma variante específicos do vírus da dengue a um quadro clínico particular.

A febre da dengue (DF) é caracterizada por sintomas inespecíficos como cefaléia, febre de início súbito, dor retro-orbitária, artralgia, bradicardia, mialgia, náuseas, vômitos, exantema maculopapular, dor nos ossos e fraqueza generalizada, podendo ser confundindo com os sintomas de outras doenças infecciosas co-circulantes. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Pequenas manifestações hemorrágicas também podem ser observadas em alguns casos.

A febre hemorrágica da dengue (DHF) além dos sintomas da DF se caracteriza também por hemorragias diversas (que incluem petéquias, púrpuras e equimoses), trombocitopenia, extravasamento de plasma, que é atribuído pelo aumento da permeabilidade vascular, e manifestado por valores elevados de hematócrito, hipoproteinemia ou efusão no interior das cavidades serosas (ROTHMAN, 1997; WHO, 1997; MALAVIGE *et al.*, 2004). Este quadro pode se agravar rapidamente e o indivíduo entrar em choque hipovolêmico (síndrome de choque da dengue - DSS), e evoluir para óbito. Alguns dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis por esse fenômeno ainda são desconhecidos, principalmente pela falta de um modelo animal que reflita as formas graves da doença (BENTE; RICO-HESSE, 2006; VASILAKIS; WEAVER, 2008).

Algumas teorias são propostas para explicar o desenvolvimento da DHF. Mecanismos imunopatológicos desempenhariam um importante papel no desenvolvimento da DHF/DSS (KURANE; ENNIS, 1994; ROTHMAN; ENNIS, 1999). Uma prevalência de DHF é observada mais frequentemente após uma infecção secundária por um segundo sorotipo de vírus da dengue, possivelmente decorrente do fenômeno dos anticorpos potencializadores da infecção (*antibody dependent-enhancement* – ADE) (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977; MALAVIGE *et al.*, 2004). Os anticorpos produzidos durante a primeira infecção seriam não neutralizantes ou sub-neutralizantes contra o segundo sorotipo, potencializando a infecção através da interação da porção Fc do complexo partícula viral-imunoglobulina, facilitando a penetração em células alvo do hospedeiro (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977).

Observações recentes indicam que o perfil clínico da doença tem se modificado e complicações como manifestações neurológicas (SUMARMO *et al.*, 1978; GUBLER; TRENT, 1993; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2005; MISRA *et al.*, 2006; DOMINGUES *et al.*, 2007) e hepatomegalia com falha hepática fulminante (RIGAU-PÉREZ *et al.*, 1998; NOGUEIRA *et al.*, 2002; LING; WILDER-SMITH; LEO, 2007) têm sido descritas com relativa frequência. O atual diagnóstico de doença neurológica associada com dengue é baseada no desenvolvimento de manifestações neurológicas em pacientes com sorologia IgM positiva para dengue. Estas manifestações incluem síndrome de *Guillain-Barré* (GBS), encefalite/encefalopatia, mielite, meningite, encefalomielite aguda, polineuropatia, mononeuropatia facial e ulnar, além de hemorragias cerebromeningeais (PATEY *et al.*, 1993; SOLOMON *et al.*, 2000; YAMAMOTO *et al.*,

2002; PALMA-DA-CUNHA-MATTA *et al.*, 2004; CHOTMONGKOL *et al.*, 2004; PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2009). A fisiopatologia do quadro neurológico na infecção pelo DENV pode ser causada por fatores indiretos como edema cerebral, hemorragia cerebral, falência hepática fulminante com encefalopatia portosistêmica, anóxia cerebral, hemorragia microcapilar e liberação de produtos tóxicos (SUMARMO *et al.*, 1983; LUM *et al.*, 1996) ou estar diretamente relacionado com a replicação viral no SNC causando meningites, encefalites, mononeuropatia e polineuropatias (BHOOPAT *et al.*, 1996; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 1998).

Os casos que apresentam manifestações clínicas não usuais são atualmente classificados pelo Ministério da Saúde do Brasil como dengue com complicações (DCC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A mudança do perfil clínico associado à dengue pode ser devido a inúmeros fatores, incluindo a cepa do vírus infectante, o estado imunológico do hospedeiro, ou ainda, o maior poder infectivo de mosquitos vetores (RICO-HESSE *et al.*, 1997; MANGADA; IGARASHI, 1998; LEITMEYER *et al.*, 1999, DUARTE DOS SANTOS *et al.*, 2002). Provavelmente, tanto os fatores virais como do hospedeiro devem contribuir para a gravidade da doença, porém a importância de cada um permanece indeterminada.

Estratégias que visam avaliar a interação entre o vírus da dengue e as células do hospedeiro têm sido utilizadas para uma melhor compreensão sobre os processos de morfogênese e patogenicidade desses vírus.

1.6.1 Modelo murino no estudo da patogênese da dengue

A falta de um modelo animal apropriado que reflita as formas graves da doença dificulta a caracterização de alguns aspectos envolvidos na patogênese da dengue. Nos últimos anos, embora com limitações, o modelo de infecção em camundongos vêm sendo caracterizado no estudo da patogênese do vírus da dengue. Estes estudos incluem infecção por diferentes vias, infecção com cepas neuroadaptadas em camundongos, linhagens de camundongos quiméricos transplantados com células humanas e linhagens de camundongos *knockout* para diversos genes (YAUCH; SHRESTA, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2009). Isolados clínicos do DENV adaptados em cérebro de camundongos, apresentam aumento da neurovirulência nestes animais (SABIN; SCHLESINGER, 1945; COLE; WISSEMAN, 1969) e atenuação em voluntários humanos (HOTTA, 1952; SABIN, 1952). Este modelo foi predominantemente utilizado para testar a eficácia de vacinas de DENV (KAUFMAN *et al.*, 1987; BRAY *et al.*, 1989; FALGOUT *et al.*, 1990, VAN DER MOST *et al.*, 2000). Para se obter camundongos que pudessem ser inoculados via periférica, e não pelo sistema nervoso central, foram desenvolvidas linhagens quiméricas e imunocomprometidas, entre elas camundongos SCID, AG129, Balb/c, A/J, entre outros (SHRESTA *et al.*, 2006; YAUCH; SHRESTA, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2009; RICO-HESSE, 2010). Em contrapartida, o uso de linhagens não isogênicas, como linhagem *Swiss*, fornece um *background* imunológico heterogêneo da população de camundongos (RICE; O'BRIEN, 1980; CUI; CHESSON; HOPE, 1993), o que reproduziria o cenário encontrado nas epidemias de dengue na população.

Em 1998, Desprès *et al.*, com o intuito de estudar alguns aspectos da patogênese da dengue, estabeleceram um modelo murino de encefalite da dengue através de passagens seriadas e alternadas do isolado clínico FGA/89 em cérebro de camundongos *Swiss* e em células de linhagem AP61 (*Aedes pseudocutellaris*), tentando mimetizar o ciclo de transmissão natural do vírus (Figura 1.11A). Após seis passagens, duas variantes neurovirulentas foram geradas, denominadas FGA/NA-d1d e FGA/NA-a5c, ambas causando encefalite fatal nos animais. Os genomas dessas variantes, quando comparados com a cepa parental, apresentaram substituições de aminoácidos nas proteínas E e NS3, implicando o aparecimento

dessas mutações no processo de neuroadaptação desses vírus (DESPRÈS *et al.*, 1998; DUARTE DOS SANTOS *et al.* 2000; BORDIGNON *et al.*, 2007). Visando confirmar estes achados, Bordignon *et al.* (2007) realizaram experimentos similares através da passagem seriada da mesma cepa viral parental (FGA/89) em cérebro de camundongos, porém, excluindo a etapa de infecção em culturas celulares (Figura 1.11B). Esse protocolo gerou a cepa neurovirulenta FGA/NA-P6 que, quando comparada com a cepa parental, apresentou substituições de aminoácidos que, embora não sendo idênticas às aquelas previamente identificadas na cepa FGA/NA-d1d, mapeavam nos mesmos domínios das proteínas E e NS3 (Quadro 1.1).

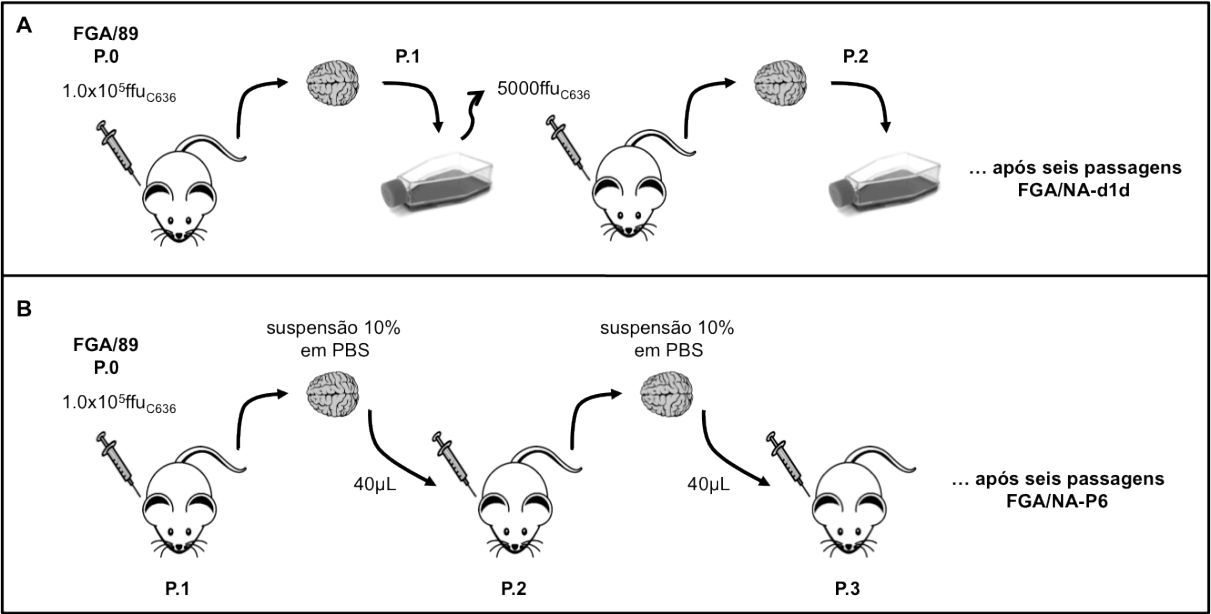


Figura 1.11 – Esquema da neuroadaptação da cepa FGA/89 em modelo murino. **A.** Geração da cepa FGA/NA-d1d (DESPRÈS *et al.*, 1998). **B.** Geração da cepa FGA/NA-P6 (BORDIGNON *et al.*, 2007).

Cepa viral	Envelope		NS3		
pBACDV1	Phe 402 TTC	Thr 405 ACC	Val 209 GTC	Leu 435 CTA	Leu 480 TTA
FGA/89	Phe 402 TTC	Thr 405 ACC	Val 209 GTC	Leu 435 TTA	Leu 480 TTA
FGA/NA-d1d	Phe 402 TTC	<i>Ile 405 ATC</i>	Val 209 GTC	<i>Ser 435 TCA</i>	Leu 480 TTA
FGA/NA-P6	<i>Leu 402 CTC</i>	Thr 405 ACC	<i>Ile 209 ATC</i>	Leu 435 TTA	<i>Ser 480 TCA</i>

Quadro 1.1 – Substituições de aminoácidos identificadas nos genomas dos vírus neuroadaptados FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6, em comparação com a cepa parental FGA/89 e com o genoma do clone infeccioso pBACDV1.

As mutações identificadas em ambos os trabalhos parecem estar relacionadas com o processo de neuroadaptação do DENV. Desta maneira, a caracterização destes marcadores moleculares poderia contribuir para o entendimento da patogênese da infecção pelo vírus da dengue, bem como, fornecer subsídios que possam explicar o envolvimento do SNC em casos graves da doença.

1.7 Clones infecciosos e replicons como ferramentas genéticas

A tecnologia do DNA recombinante permite a análise e modificação molecular de genomas, obtendo desta forma conhecimentos mais profundos em sua organização e expressão. Os clones infecciosos de vírus RNA de polaridade positiva são construções genéticas compostas pela sequência genômica completa do vírus na forma de DNA. A inserção de sítios que permitem a transcrição *in vitro* ou *in vivo*, possibilita a geração de uma molécula de RNA infecciosa que apresenta as mesmas propriedades do RNA viral, sendo capaz de gerar partículas virais indistinguíveis de vírus naturais (RICE *et al.*, 1989; MEYERS; THIEL; RÜMENAPF, 1996; RUGGLI; RICE, 1999; KUMMERER; RICE, 2002). A vantagem da obtenção de um clone a partir de um genoma viral em um vetor é a sua fácil propagação em sistema eucarioto e ampliação da progênie viral homogênea em cultura celular (RUGGLI; RICE, 1999), diferentemente das amostras biológicas onde o RNA viral se apresenta sob a forma de *quasispecies* (HOLMES, 2003; LIN *et al.*, 2004). Clones infecciosos são, portanto uma ferramenta indispensável para o estudo, por exemplo, do efeito de mutações pontuais no genoma viral, funções biológicas do vírus, processamento da poliproteína e virulência.

Uma alternativa aos clones infecciosos é a utilização de clones subgenômicos, os replicons, que possuem todos os elementos necessários para replicação do material genético em células, porém não possuem as sequências codificadoras das proteínas estruturais e, portanto não são capazes de gerar novas partículas virais (JONES; PATKAR; KUHN, 2005). Alguns autores demonstraram que a omissão total da sequência das proteínas estruturais resulta na ausência de replicação (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997). É necessária a presença dos nucleotídeos que codificam a porção N-terminal da proteína C, onde está localizada

a sequência 5'CS, que é complementar a sequência 3'CS da região 3'NTR (HAHN *et al.*, 1987), sendo essa complementaridade essencial para a replicação (BREDENBEEK *et al.*, 2003; LO *et al.*, 2003; ALVAREZ *et al.*, 2005a). Além disso, a manutenção da sequência sinal da proteína NS1, codificada pela porção C-terminal da proteína E, garante o correto endereçamento e processamento da mesma (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH; RICE, 2001). A maior vantagem dos sistemas subgenômicos de replicons é o fato de permitirem análise de variáveis que estão envolvidas no processo de replicação viral, pois isolam as proteínas não-estruturais das estruturais que estão mais relacionadas aos processos de montagem da partícula viral (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997).

Já foram descritos clones infecciosos para vários vírus do gênero *Flavivírus*, como YFV (RICE *et al.* 1989), os quatro sorotipos do vírus da dengue (LAI *et al.*, 1991; KAPOOR *et al.*, 1995b; BLANEY JR *et al.*, 2004a; SUZUKI *et al.*, 2007), vírus da encefalite japonesa (SUMIYOSHI; HOKE; TREND, 1992), vírus Kunjin (KHROMYKH; WESTAWAY, 1994), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (GRITSUN; GOULD, 1995); vírus do Oeste do Nilo (YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001), entre outros. Assim como os clones infecciosos, vários replicons também já foram descritos, para vírus da dengue tipo 1, 2 e 3 (SUZUKI *et al.*, 2007; PANG; ZHANG; DAYTON, 2001; ALVAREZ *et al.*, 2005a; JONES *et al.*, 2005; HOLDEN *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2007, MOSIMANN *et al.*, 2010), vírus da febre amarela (CORVER *et al.*, 2003; JONES; PATKAR; KUHN, 2005), vírus Kunjin (KHROMYKH; WESTAWAY, 1997), vírus da encefalite transmitida por carrapatos (GEHRKE *et al.*, 2003), vírus da Febre hemorrágica de Omsk (YOSHII; HOLBROOK, 2009), vírus da encefalite japonesa (YUN *et al.*, 2007) e vírus do Oeste do Nilo (YAMSHCHIKOV *et al.*, 2001; SHI; TILGNER; LO, 2002; SCHOLLE *et al.*, 2004; ROSSI *et al.*, 2005).

Os primeiros sistemas de clones infecciosos desenvolvidos para *Flavivirus* foram para o vírus da febre amarela (RICE *et al.*, 1989) e DENV4 (LAI *et al.*, 1991). A estratégia para contornar os problemas de instabilidade de clonagem do genoma viral completo em um único plasmídeo de *E.coli* foi a utilização de dois plasmídeos contendo fragmentos separados, seguido de ligação *in vitro* para gerar um molde para a produção de RNAs sintéticos do genoma completo. Outras estratégias foram desenvolvidas na tentativa de se propagar cDNAs do genoma inteiro, que pudessem ser utilizados diretamente como moldes para a produção de RNAs infecciosos, como o uso de plasmídeos de levedura (POLO *et al.*, 1997; PURI *et al.*, 2000), plasmídeos

de baixa cópia (GUALANO *et al.*, 1998) e vetores de cromossomos artificiais de bactérias (BAC) (VAN DER MOST; CORVER; STRAUSS, 1999). A instabilidade de alguns clones em sistemas bacterianos pode ser devido a potencial toxicidade de alguns fragmentos dos genomas virais, porém não existem dados no caso de DENV comprovando esta hipótese. (BOYER; HAENNI, 1994).

Com o uso da tecnologia de genomas infecciosos e replicons é possível inserir uma ou um conjunto de mutações, para ensaiar o seu possível papel na patogênese decorrente da infecção viral. Essas construções têm sido utilizadas para avaliação de potenciais vacinas, como vetores para expressão de proteínas heterólogas ou para se estudar o papel de mutações e deleções tanto nas proteínas virais quanto nas regiões 5'NTR e 3'NTR do genoma (GUIRAKHOO *et al.*, 2002, 2004, 2006; HUANG *et al.*, 2003; MATEU *et al.*, 2007; KINNEY *et al.*, 1997; GUALANO *et al.*, 1998; CAMPBELL; PLETNEV, 2000; KÜMMERER; RICE, 2002; HAYASAKA *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2007; PLETNEV, 2001; SHI *et al.*, 2002; BREDENBEEK *et al.*, 2003; YUN *et al.*, 2003; TAJIMA *et al.*, 2006; BONALDO *et al.*, 2007).

A grande maioria dos ensaios utilizando clones infecciosos no estudo de marcadores de virulência para o vírus da dengue se restringe à porção estrutural do vírus, ou ainda, utilizam clones quiméricos, onde as proteínas estruturais são substituídas por proteínas similares de outros flavivirus (KAWANO *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1995; GUALANO *et al.*, 1998; BRAY *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 2003; PURDY; CHANG, 2005; PIERRO *et al.*, 2006; HSIEH *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Doenças hemorrágicas virais são síndromes multi-sistêmicas caracterizadas por dano vascular difuso e alteração na homeostase do sistema imunológico, que frequentemente são acompanhadas por hemorragias. Os vírus geralmente associados a essas síndromes são vírus que possuem envelope, de genoma RNA e zoonóticos. Os quatro sorotipos da dengue podem causar desde uma febre indiferenciada até casos mais graves, como o desenvolvimento de DHF e DSS, devido ao extravasamento excessivo de plasma (HALSTEAD, 1988; GUBLER, 1994; MONATH, 1994). Observações recentes indicam que as formas clínicas da doença têm mudando e manifestações neurológicas são observadas frequentemente (LUM *et al.*, 1996; RAMOS *et al.*, 1998; SOLOMON *et al.*, 2000; CAM *et al.*, 2001; DOMINGUES *et al.*, 2007). Os mecanismos precisos envolvidos no desenvolvimento das formas graves e não-usuais da dengue ainda permanecem desconhecidos.

Estratégias genéticas que permitam caracterizar mecanismos moleculares associados à virulência e a resposta do hospedeiro deverão contribuir para interferir de forma controlada em etapas críticas durante a infecção viral. A tecnologia de replicons/clones infecciosos se mostra bastante atraente para este propósito, pois permite que mutações relacionadas a um determinado fenótipo viral possam ser ensaiadas *in vitro* e *in vivo*. Em uma etapa mais avançada, essas construções podem ser testadas quanto sua capacidade de replicação e/ou produção de partículas virais na ausência e presença de potenciais inibidores.

Visando estudar a neuropatologia da dengue e mapear possíveis marcadores moleculares de virulência, foram realizados estudos com cepas neuroadaptadas em cérebro de camundongos, e algumas mutações, que poderiam estar relacionadas com este fenótipo, foram identificadas (Quadro 1.1) (DESPRÈS *et al.*, 1998; DUARTE DOS SANTOS *et al.*, 2000; BORDIGNON *et al.*, 2007)

Para definir o envolvimento de cada uma destas substituições de aminoácidos na aquisição do fenótipo de neurovirulência, o objetivo geral deste trabalho foi gerar e caracterizar clones infecciosos contendo as mutações identificadas, inseridas isoladamente ou em conjunto no genoma infeccioso pBACDV1 da cepa viral DENV1 BR/90, previamente estabelecido (SUZUKI *et al.*, 2007).

Os objetivos específicos foram:

- Amplificar os fragmentos contendo as mutações de interesse e cloná-los no contexto do genoma infeccioso de dengue sorotipo 1, pBACDV1;
- Transfectar os RNAs gerados por transcrição *in vitro* a partir dos clones infecciosos mutados em células de inseto C6/36;
- Amplificar os estoques virais em culturas celulares de inseto C6/36;
- Determinar a sequência nucleotídica completa dos vírus amplificados em culturas de células;
- Caracterizar os vírus recombinantes contendo as mutações de interesse *in vitro* e *in vivo*.
- Analisar a modulação da expressão de alguns genes do hospedeiro em resposta a infecção pelos vírus parental e neurovirulentos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Construção de clones recombinantes

3.1.1 Amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse

A amplificação das mutações em estudo, localizadas nas proteínas de Envelope e não-estrutural NS3 (Quadro 1.1, item 1.6.1), foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) de fusão, utilizando como molde o genoma viral do clone infeccioso pBACDV1. A amplificação dos fragmentos consistiu em duas reações: na primeira reação eram amplificados dois fragmentos (fragm A e fragm B) para cada mutação, e na segunda, também chamada PCR de fusão, era feita a fusão dos dois fragmentos (fragm fusão – representação esquemática na Figura 3.1) através da complementariedade das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores de polaridade negativa do fragm A e positiva do fragm B, que continham a mutação (Quadro 3.1). Com exceção da mutação NS3-435, que foi amplificada em uma única reação.

Os oligonucleotídeos iniciadores complementares de polaridade negativa do fragm A e positiva do fragm B foram desenhados a fim de possuírem, além da mutação de interesse, uma mutação silenciosa que modifica a sequência de um sítio de enzima de restrição, o que facilita a triagem de possíveis clones em etapas posteriores. Os sítios mutados foram: BstBI para E405, EcoRV para NS3-209 e BsaBI para NS3-480. A mutação E402 já está localizada na sequência do sítio da enzima BstBI, também podendo, portanto, ser utilizado na triagem dos clones. A estratégia da mutação NS3-435 não possui outra mutação para triagem de clones.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit comercial *TripleMaster System* (Eppendorf), seguindo instruções do fabricante. A amplificação dos fragm A e B foi submetida aos seguintes ciclos: 95°C por 3 min., 25 ciclos de 95°C por 30 seg., 50°C por 30 seg. e 68°C por 5 min., enquanto a amplificação do PCR de fusão foi submetida a 95°C por 3 min., 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 60-62°C por 30 seg. e 68°C por 5 min. Alíquotas de 10% das reações de PCR foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio.

Para a purificação, os amplicons foram excisados de géis de agarose e purificados utilizando o kit comercial *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante e recuperados em 50 a 100µL de tampão EB fornecido no kit.

Quadro 3.1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse para clonagem.

MUTACÃO	NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA*	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA**	TAMANHO FRAGMENTO	TAMANHO FRAGMENTO FUSÃO	CLONAGEM
E402	BACUPST+	5' A GGA AAC GAC AGG TGC TG 3'	positiva	17704 - 17721	2324pb		
	E402MREV	5' CC TCG GGC GGT TGC TTC GAG CAT TTT CCC 3'	negativa mutado	2129 - 2157		2887pb	NotI MluI
	E402MFORW	5' GGG AAA ATG CTC GAA GCA ACC GCC CGA GG 3'	positiva mutado	2129 - 2157	595pb		
	D18-	5' TTC CTT GGG CCA AAA TTC C 3'	negativa	2702 - 2720			
E405	D1+	5' GC GGC CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGT TGT TAG TCT ACG TGG 3'	positiva	17844 - 18	2160pb		
	E405MREV	5' CC TCG GGC Ga T TGC TTC aAA CAT TTT CCC TAT 3'	negativa mutado	2126 - 2157		2720pb	NotI MluI
	E405MFORW	5' GGG AAA ATG TTT GAA GCA ATC GCC CGA GGA GC 3'	positiva mutado	2129 - 2160	595pb		
	D18-	5' TTC CTT GGG CCA AAA TTC C 3'	negativa	2702 - 2720			
NS3-209	NS1 5'	5' GAC TCG GGA TGT GTA ATC AAC T 3'	positiva	2420 - 2441	2733pb		
	NS3.209MREV	5' CTCACGGATATGGCTGGAAAGTATCTTC 3'	negativa mutado	5124 - 5152		3323pb	MluI BsiWI
	NS3.209MFORW	5' GAA GA TA c CTT CCA GCC ATA a TC CGT GAG 3'	positiva mutado	5124 - 5152	619pb		
	CN20-	5' GTGACACATAGTCCAGTCA 3'	negativa	5722 - 5742			
NS3-435	D23+	5' GAA GGC GAA GTT GGA GCC 3'	positiva	4877 - 4894	989pb	---	BsiWI RsrII
	NS3.435MREV	5' GG CAT CGG TCC GGC TAG AAT GAC ACG CTC TGG ACC ATC TTT Tga TA 3'	negativa mutado	5822 - 5865			
NS3-480	D23+	5' GAA GGC GAA GTT GGA GCC 3'	positiva	4877 - 4894	1099pb		
	NS3.480MREV	5' GATC CTC gTC ATT ATT TgaAGG CTG TCC C 3'	negativa mutado	5947 - 5975			
	NS3.480MFORW	5' G GGA CAG CCT TcaAAT AAT GAc GAG GAT C 3'	positiva mutado	5947 - 5975	2292pb		BsiWI NheI
	D8-	5' CGG CTC GAG TGC CTT TCC AAA CTC TCC 3'	negativa	8957 - 8974	3027pb		
	CN39-	5' CAT CAA CAC CGC CGC TGT CAG TGT C 3'	negativa	7144 - 7168			

Sequências sublinhadas referentes aos sítios de restrição mutados silenciosamente para seleção de clones positivos.

* Cortando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR90 (GenBank AF226885), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

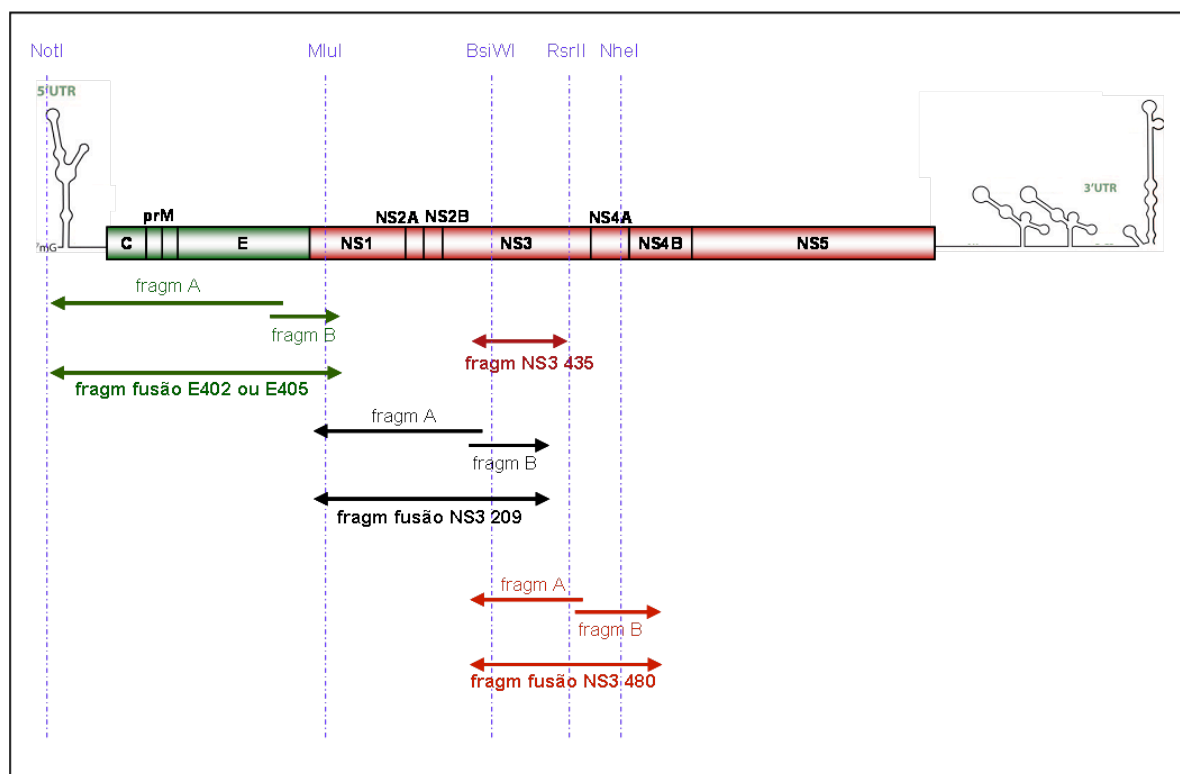


Figura 3.1 – Representação esquemática das etapas da amplificação dos fragmentos contendo as mutações de interesse (fragm A, fragm B e fragm fusão) e as respectivas enzimas de restrição utilizadas para cada estratégia de clonagem.

3.1.2 Clonagem dos fragmentos mutados em vetor pGEM-T Easy

Os fragmentos amplificados e purificados E-402, E-405 e NS3-435 que se mostraram de difícil clonagem em pBACDV1 (genoma infeccioso DENV1), foram utilizados para clonagem em Sistema *pGEM-T Easy* (Promega) para posterior transferência do fragmento para pBACDV1.

O *pGEM-T Easy* é um vetor de alta cópia, utilizado para clonagem direta de produtos de PCR, preparado pela digestão com a enzima EcoRV e adição de uma timidina em cada 3' terminal. O vetor também contém promotor do bacteriófago T7 e marcador de seleção para o antibiótico ampicilina (Figura 3.2). A reação de ligação foi realizada seguindo recomendações do fabricante. A clonagem do inserto em vetor *pGEM-T Easy* interrompe a sequência que codifica para o gene da β -galactosidase. Clones recombinantes podem ser triados pelo sistema de α -complementação, sendo identificados pela coloração das colônias bacterianas quando crescidas em placas de cultura contendo agente indutor e seu substrato.

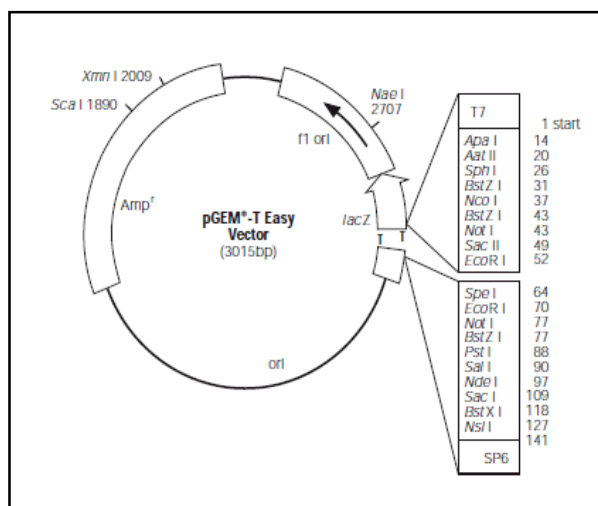


Figura 3.2 – Mapa do plasmídeo *pGEM-T Easy* (Promega).

3.1.3 Preparo de células bacterianas de *Escherichia coli* (*E.coli*) linhagens TOP10 e TOP10F' cálcio competentes

Foi seguido o método de Mandel & Higa (1970). Estoques em glicerol das linhagens TOP10 e TOP10F', armazenados em N₂ líquido, foram estriados em placas contendo meio *Luria Broth* (LB) sem antibiótico para TOP10 e LB contendo 12.5µg/mL de tetraciclina para TOP10F', e incubados a 37°C por 16 horas. Uma colônia bacteriana isolada de cada linhagem foi inoculada em 20 mL de meio líquido LB1x sem antibiótico para TOP10 e LB1x contendo 12.5µg/mL de tetraciclina para TOP10F'. A cultura foi incubada a 37°C por 16 horas sob agitação constante. O pré-inóculo foi diluído 1:10 em 200mL de meio LB1x contendo o antibiótico apropriado. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante até o início da fase de crescimento exponencial atingindo uma absorbância entre 0.4 e 0.6 a 600nm. Após 20 min. no gelo, a cultura foi centrifugada a 4.000xg por 5 min. a 4°C (Centrífuga Sorvall RC 5B Plus, rotor SLA 1500), o sobrenadante desprezado, e o sedimento ressuspenso em metade do volume da cultura original (100mL) de uma solução 100mM CaCl₂/10mM Hepes gelada e estéril. As células foram incubadas no gelo durante 20 minutos. A suspensão foi submetida a uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o sedimento ressuspenso em 1/50 do volume da cultura original (4mL) da solução 100mM CaCl₂/10mM Hepes/10% glicerol gelada e estéril, incubado no gelo por 2 horas e

estocado em alíquotas de 100 μ L em tubos eppendorf a -70°C até a utilização. Durante todo o procedimento as amostras eram mantidas em gelo.

3.1.4 Transformação de bactérias cálcio-competente TOP10F' com plasmídeos *pGEM-T Easy*

Para a transformação de bactérias competentes com as ligações inserto-vetor *pGEM-T Easy*, células competentes TOP10F' foram descongeladas em banho de gelo (1 tubo com 100 μ L para cada transformação). Todo o volume das ligações era adicionado diretamente nos tubos contendo as bactérias competentes, e esses eram mantidos no gelo por 30 min. Em seguida era realizado choque térmico a 42°C por 2 min., adicionados 900 μ L de meio SOC e os tubos incubados por 1 hora a 37°C sob agitação constante para a recuperação das células transformadas. Após este período, alíquotas de 50 μ L e 100 μ L das bactérias transformadas foram semeadas em placas contendo meio LB sólido suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, 0.4mM de IPTG (*Isopropil- β -D-tiogalactopirosídeo*) e 0.04mg/mL de X-gal (*bromo-chloro-indolyl-galactopyranosídeo*) e incubadas a 30°C por 16 horas. Colônias brancas (recombinantes) foram transferidas para uma placa-mãe que consistia do mesmo meio descrito acima, para a identificação de cada eventual clone através de um papel quadriculado numerado colado no fundo. Cada clone candidato era transferido da placa de crescimento para um quadrado numerado da placa-mãe com o auxílio de um palito de dente e a placa era incubada a 30°C , por 16 horas. Este procedimento permite uma segunda seleção de colônias supostamente brancas e a análise de possíveis colônias recombinantes de forma inequívoca.

3.1.5 Minipreparação do DNA plasmidial dos clones recombinantes em *pGEM-T Easy* e sequenciamento

Após a triagem e identificação das colônias brancas na placa-mãe, algumas colônias contendo os prováveis clones foram selecionadas e inoculadas em 3mL de meio LB líquido suplementado com 100µg/mL de ampicilina e crescidas a 30°C por 16 horas sob agitação constante. As culturas crescidas em meio líquido eram sedimentadas por uma breve centrifugação para minipreparação dos plasmídeos com o kit *Wizard Plus SV Minipreps kit* (Promega), de acordo com protocolo descrito pelo fabricante. Todos os clones positivos foram estocados em glicerol 50% v/v, em um volume total de 1mL, a -70°C.

Para a confirmação da sequência nucleotídica dos clones recombinantes e verificação de eventuais mutações indesejadas, os clones E402pGEM e NS3-435pGEM foram sequenciados no Instituto Carlos Chagas (ICC) usando *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), e os clones E405pGEM foram enviados para sequenciamento na Macrogen (Seoul, Coréia do Sul) (Quadro 3.2).

AMOSTRA	NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA*
E402 pGEM	D2-	5' CAA CTG TGA ACC AGT TGA C 3'	negativa	163 - 181
	5'SP6	5' AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GAC 3'	positiva	.1 - 24
	D1lanc+	5' TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC GC 3'	positiva	132 - 160
	PhD5-	5' ATC ATG TGT GGC TCT CCC CCT CGT GTG GTC AAA 3'	negativa	442 - 474
	pM5'ss	5' ATG AAC AGG AGG AAA AGA TCC GT 3'	positiva	377 - 399
	PhD7+	5' TCC GTG ACC ATG CTC CTC ATG 3'	positiva	395 - 415
	D2lanc-	5' CAC CAG CAG TCA ACG TCA TCT GGT TCC GCC TC 3'	negativa	608 - 639
	M5'	5' GCGGATCCTCCGTGGCACTGGCCCCACAC 3'	positiva	701 - 730
	prM3'	5' GGT GTC TCA AAG CCC AAG T 3'	negativa	809 - 827
	EcoNsi+	5' ATG CAT TGA AGC TA 3'	positiva	1111 - 1124
	EcoApa-	5' CCT TGT GTT GGA CAT CTT GAA TCG GTG GTG G 3'	negativa	1137 - 1167
	D1E5'Eco	5' CAT GCG ATG CG 3'	positiva	934 - 944
	PhD15-	5' CCC AGT ACG ACT ACT TCC TG 3'	negativa	1676 - 1695
	PhD16+	5' CAG GAA GTA GTC GTA CTG GG 3'	positiva	1676 - 1695
	PhD17-	5' GGG GAT CTT GCA TGG CGC A 3'	negativa	1924 - 1942
	D1 DomB+	5' ACG GGA TCC GTG ATG TGC ACA GGC TCA TTT 3'	positiva	1831 - 1852
	D1 DomB-	5' TGC GGT ACC GCT GCT TCC TTT CTT GAA CCA 3'	negativa	2105 - 2125
	PhD20+	5' GGG ACT TCG GCT CTA TAG GA 3'	positiva	2193 - 2212
	NarXho-	5' GTA CCT AGG AGT CAT GGT TCA AGC G 3'	negativa	2395 - 2419
	NS15'	5' GAC TCG GGA TGT GTA ATC AAC T 3'	positiva	2420 - 2441
	CN12-	5' AGC ATC TCC TAC AAC CAC TG 3'	negativa	2679 - 2698
	D3+	5' TCA AGG AGC ACG TCA CTT TCG 3'	positiva	2342 - 2362
E405 pGEM	PhD20+	5' GGG ACT TCG GCT CTA TAG GA 3'	positiva	2193 - 2212
	PhD17-	5' GGG GAT CTT GCA TGG CGC A 3'	negativa	1924 - 1942
	D1E5' Eco	5' CAT GCG ATG CG 3'	positiva	934 - 944
	PhD5-	5' ATC ATG TGT GGC TCT CCC CCT CGT GTG GTC AAA 3'	negativa	442 - 474
	prM3	5' GGT GTC TCA AAG CCC AAG T 3'	negativa	809 - 827
	EcoApa-	5' CCT TGT GTT GGA CAT CTT GAA TCG GTG GTG G 3'	negativa	1137 - 1167
	D1 DomB+	5' TGT GAT GTG CAC AGG CTC ATT T 3'	positiva	1831 - 1852
NS3-435 pGEM	PhD15-	5' CCC AGT ACG ACT ACT TCC TG 3'	negativa	1676 - 1695
	CN20-	5' GTG ACA ACA TAG TCC CAG TC 3'	negativa	5722 - 5742
	CN14+	5' GGA AAT GAC ATT GCC AAC TG 3'	positiva	5624 - 5647
	CN10+	5' CCC GGC ACA TCT GGA TC 3'	positiva	4912 - 4929
	..28mer	5' CCT GTG TGC TCA CTC TTC ACT GCT GTT G 3'	negativa	5253 - 5280
	+28mer	5' GAT ATC TTC CAG CCA TAG TCC GTG AGG CC 3'	positiva	5127 - 5155

* Contando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR/90 (*GenBank* AF226685), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

Quadro 3.2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento dos possíveis clones recombinantes clonados em *pGEM-T Easy*.

3.1.6 Minipreparação do genoma infeccioso pBACDV1

O genoma infeccioso pBACDV1 (SUZUKI *et al.*, 2007) foi construído em um cromossomo artificial de bactéria (BAC), vetor de cópia única, e contém o genoma completo do vírus da dengue tipo 1, cepa BR/90 (número de acesso *GenBank* AF226685), a sequência do promotor da T7 RNA polimerase (T7 prom) adicionado de uma base G, imediatamente antes do primeiro nucleotídeo do genoma viral e, a sequência da ribozima do vírus da hepatite delta (HDV-RZ), o sítio de terminação da T7 RNA polimerase (T7 term) e o sítio de restrição Swal, imediatamente após o término do genoma viral. O vetor ainda possui marcador de seleção para o antibiótico cloranfenicol, origem de replicação OriS e fator de fertilidade F de *E. coli* (Figura 3.3).

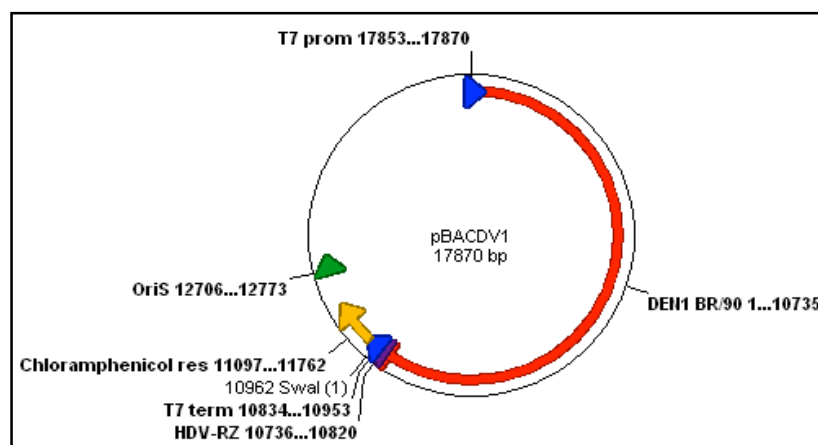


Figura 3.3 – Representação esquemática do mapa do genoma infeccioso pBACDV1.

Estoques em glicerol do genoma infeccioso pBACDV1 foram inoculados em 20mL de meio *Terrific Broth* (TB) líquido suplementado com 15µg/mL de cloranfenicol e cultivados a 30°C por 16 horas sob agitação constante. As culturas crescidas em meio líquido eram sedimentadas por uma breve centrifugação para minipreparação dos plasmídeos com o kit *Wizard Plus SV Minipreps kit* (Promega), de acordo com protocolo descrito pelo fabricante. Os DNAs eram recuperados em 50µL de água livre de nucleases fornecida no kit.

3.1.7 Sub-clonagem em pBACDV1 – clones com mutação única

O genoma infeccioso pBACDV1, os fragmentos de PCR purificados e os clones pGEM confirmados por sequenciamento foram digeridos para sub-clonagem utilizando diferentes estratégias para cada mutação.

- E402 e E405: O pBACDV1 e os clones E402pGEM e E405pGEM foram tratados com as enzimas de restrição NotI 10U/µL e MluI 10U/µL (New England Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas. Os fragmentos gerados estão representados na Figura 3.4.

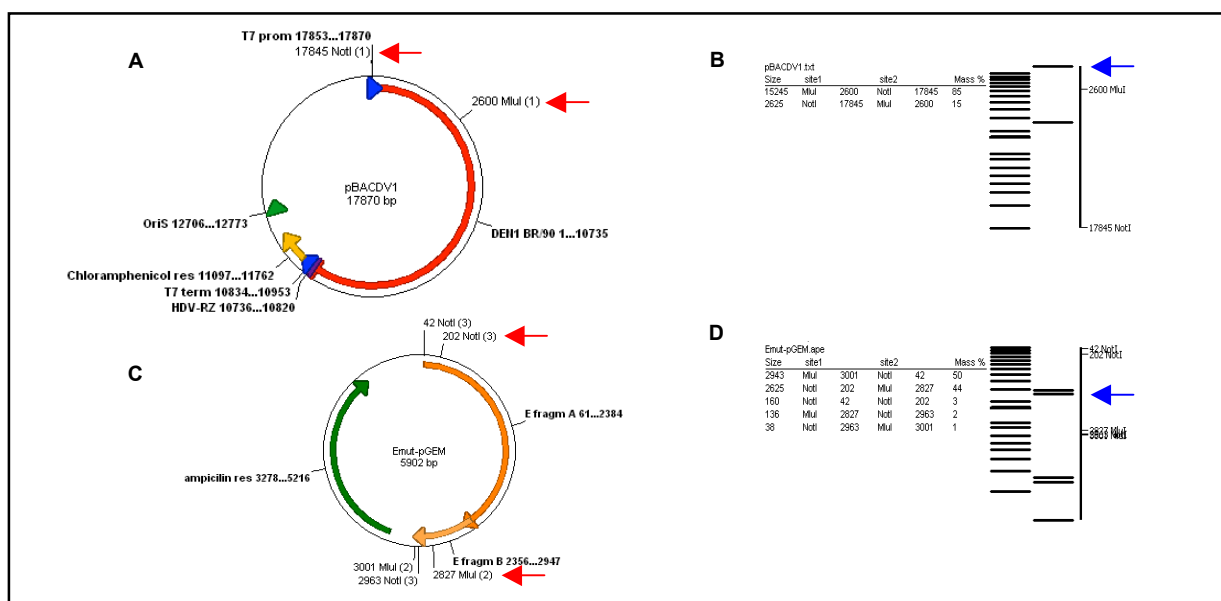


Figura 3.4 – Representação esquemática da digestão dos clones pBACDV1 e E402-pGEM ou E405-pGEM (Emut-pGEM) com as enzimas de restrição NotI e MluI. Em **A** e **C**, a representação do mapa dos plasmídeos, destacando a localização dos sítios das enzimas (setas **vermelhas**), em **B** e **D**, o perfil dos fragmentos gerados pela digestão, destacando os fragmentos a serem utilizados (setas **azuis**).

- **NS3-209**: O vetor pBACDV1 e o fragmento NS3-209, amplificado e purificado, foram digeridos com as enzimas MluI 10U/μL e BsiWI 10U/μL (New England Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas. Os fragmentos gerados estão representados na Figura 3.5.

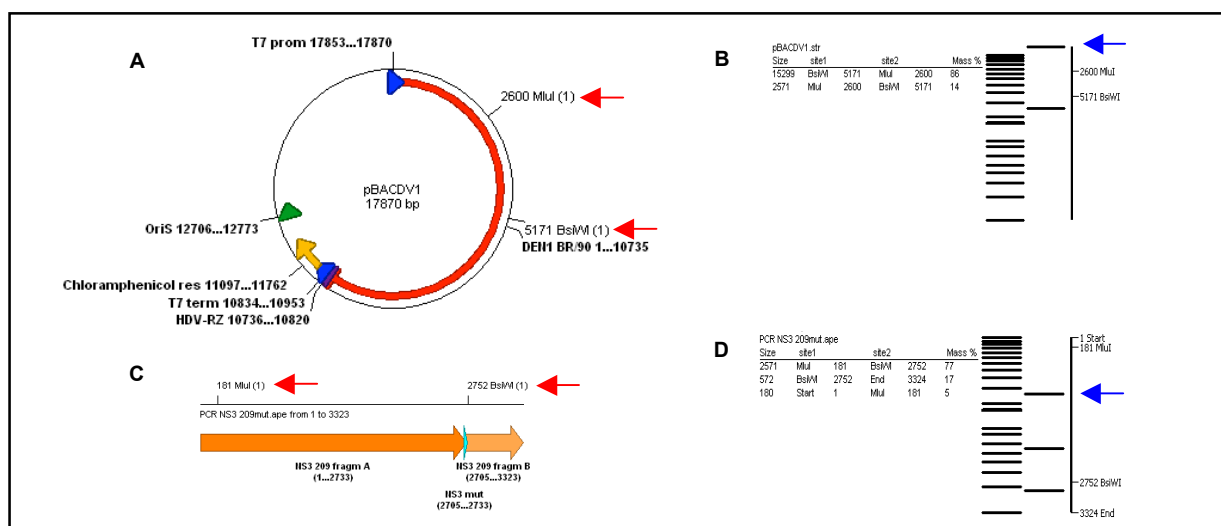


Figura 3.5 – Representação esquemática da digestão do clone pBACDV1 e do fragmento de PCR NS3-209 com as enzimas de restrição MluI e BsiWI. Em **A** e **C**, a representação do mapa do plasmídeo e do PCR, destacando a localização dos sítios das enzimas (setas **vermelhas**), em **B** e **D**, o perfil dos fragmentos gerados pela digestão, destacando os fragmentos a serem utilizados (setas **azuis**).

- **NS3-435**: O genoma infeccioso pBACDV1 e o clone NS3-435-pGEM foram digeridos com as enzimas BsiWI 10U/μL e RsrII 5U/μL (New England Biolabs), de

acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas. Os fragmentos gerados estão representados na Figura 3.6.

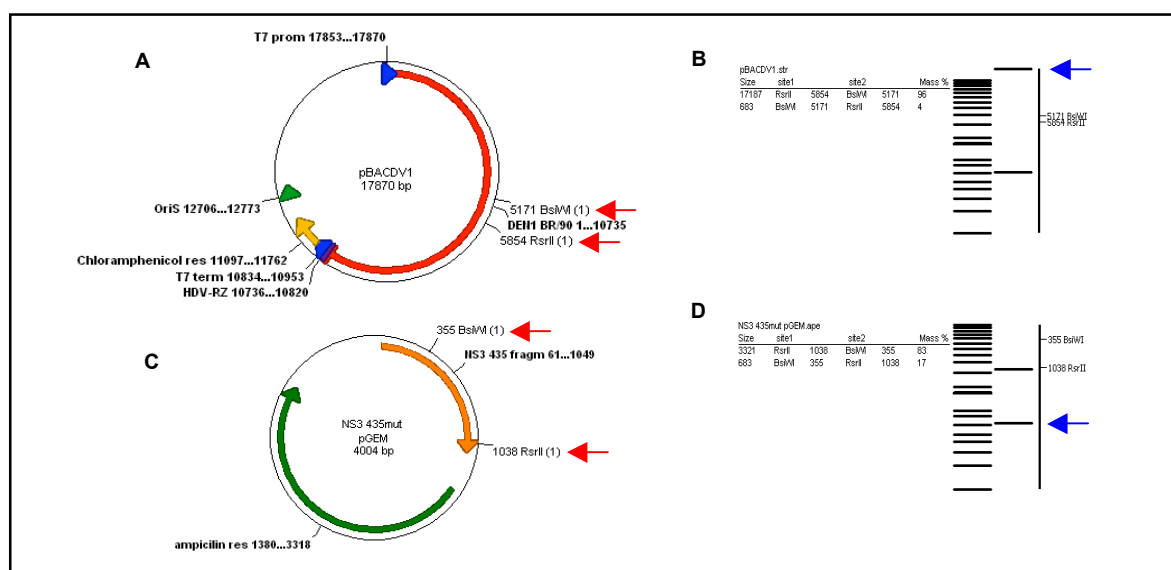


Figura 3.6 – Representação esquemática da digestão dos clones pBACDV1 e NS3-435-pGEM com as enzimas de restrição BsiWI e RsrII. Em **A** e **C**, a representação do mapa dos plasmídeos, destacando a localização dos sítios das enzimas (setas vermelhas), em **B** e **D**, o perfil dos fragmentos gerados pela digestão, destacando os fragmentos a serem utilizados (setas azuis).

- **NS3-480**: O vetor pBACDV1 e o fragmento NS3-480, amplificado e purificado, foram tratados com as enzimas BsiWI 10U/μL e NheI 10U/μL (New England Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas. Os fragmentos gerados estão representados na Figura 3.7.

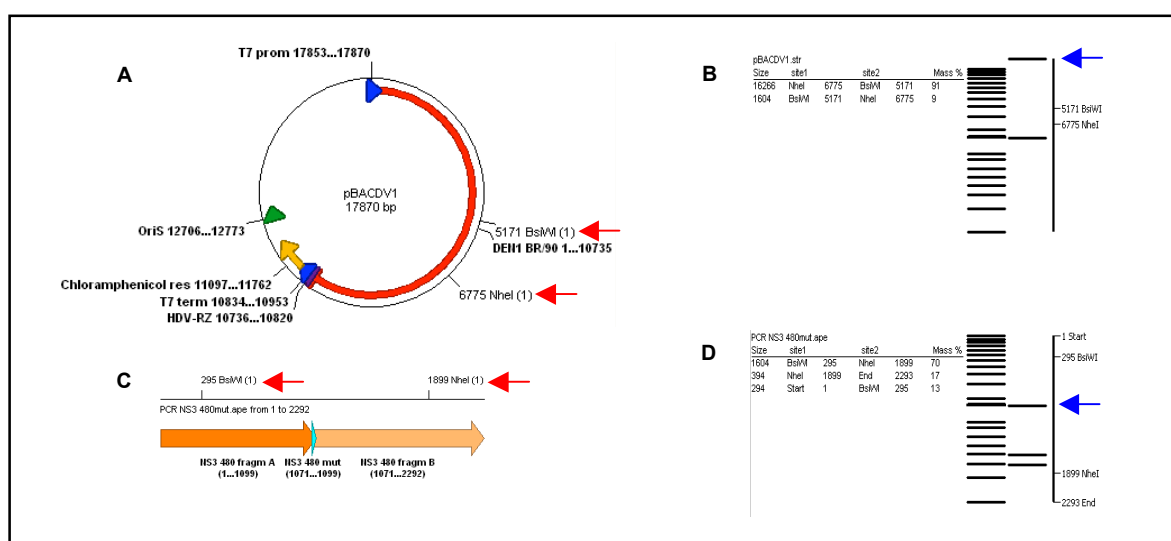


Figura 3.7 – Representação esquemática da digestão do clone pBACDV1 e do fragmento de PCR NS3-480 com as enzimas de restrição BsiWI e NheI. Em **A** e **C**, a representação do mapa do plasmídeo e do PCR, destacando a localização dos sítios das enzimas (setas vermelhas), em **B** e **D**, o perfil dos fragmentos gerados pela digestão, destacando os fragmentos a serem utilizados (setas azuis).

A substituição dos fragmentos liberados do genoma infeccioso pBACDV1 foi realizada pela ligação dos respectivos fragmentos mutados, seguindo o protocolo da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs ou USB), para um volume final de reação de 15µL. As reações foram incubadas a 16°C ou 4°C por 16 horas. As quantidades de DNA, necessárias para as reações de ligação entre o vetor pBACDV1 e os insertos, foram determinadas visualmente por eletroforeses em gel de agarose ou pela sua dosagem utilizando espectrofotômetro (Nanodrop – Thermo). Foi utilizada uma relação de 3:1 (inserto:vetor), de acordo com a fórmula representada no quadro abaixo.

$\frac{30-50 \text{ ng vetor} \times \text{kb tamanho inserto}}{\text{kb tamanho do vetor}} \times \text{relação } \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} = \text{ng de inserto}$
--

3.1.8 Transformação de bactérias cálcio-competente TOP10 com plasmídeos pBACDV1

Células bacterianas TOP10 foram transformadas com todo o volume da ligação e incubadas por 30 min. no gelo. Em seguida eram submetidas a um choque térmico a 42°C por 40 seg., adicionados 250µL de meio SOC e as células incubadas a 37°C por 1 h. sob agitação constante para sua recuperação. Após esse período, todo o volume das bactérias transformadas eram semeadas em placas contendo meio TB sólido contendo 15µg/mL de cloranfenicol e incubadas a 30°C por 16 a 48h. Após a verificação da presença de possíveis colônias recombinantes na placa, era feita uma placa mãe para a identificação de cada eventual clone, como já descrito no item 3.1.4.

3.1.9 Seleção de clones recombinantes pela técnica de PCR de colônia e confirmação por digestão

As colônias obtidas a partir da ligação com vetor pBACDV1 foram triadas pela técnica de PCR de colônia. Cada colônia era passada da placa mãe, com auxílio de um palito de dente estéril, para um tubo eppendorf (identificado com o número correspondente) contendo 10µL de água ultrapura e cada tubo era incubado a 98°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos eram centrifugados a 16000xg por 30 seg. e 1µL do sobrenadante era utilizado na reação de PCR, utilizando o kit Taq DNA Polimerase (5U/µL, Invitrogen). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões mutadas estão contidos na Quadro 3.3. A reação era submetida a um ciclo a 94°C por 3 min. e a 35 ciclos a 94°C por 30 seg., 52°C por 30 seg. e 72°C por 1 min. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0.5µg/mL de brometo de etídio.

Os fragmentos que apresentavam amplificação positiva eram, então, confirmados pela digestão com a enzima de restrição que reconhece o sítio mutado silenciosamente, de acordo com cada estratégia. Os sítios mutados para confirmação dos clones são: BstBI para E-402 e E-405, EcoRV para NS3-209 e BsaBI para NS3-480 (Quadro 3.3). A estratégia da mutação NS3-435 não possui modificações para triagem de clones.

MUTAÇÃO	NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA*	TAMANHO FRAGMENTO	ENZIMA RESTRIÇÃO TRIAGEM
E402 E405	D1 DomB+ NarXho-	5' ACG GGA TCC GTG ATG TGC ACA GGC TCA TTT 3' 5' CGC TTG AAC CAT GAC TCC TAG GTA C 3'	positiva negativa	1831 - 1852 2395 - 2419	589 pb	BstBI
NS3-209	CN10+ CN20-	5' CCC GGC ACA TCT GGA TC 3' 5' GTG ACA ACA TAG TCC CAG TC 3'	positiva negativa	4912 - 4929 5722 - 5742	831 pb	EcoRV
NS3-480	CN14+ Hel3'	5' GGA AAT GAC ATT GCC AAC TG 3' 5' TCT TCT TCC TGC TGC AAA CTC 3'	positiva negativa	5624 - 5647 6356 - 6376	753 pb	BsaBI

* Contando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR90 (GenBank AF226885), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

Quadro 3.3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação por PCR de colônia e enzimas de restrição utilizadas para digestão dos PCRs, para confirmação de clones.

As digestões foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante (Biolabs) e incubadas por 1h 30 min. em sua temperatura ideal. Os clones positivos eram identificados pela não clivagem do sítio de restrição.

3.1.10 Minipreparação dos clones recombinantes pBACDV1-mut e sequenciamento

As colônias dos clones confirmados por digestão foram inoculadas em 20mL de meio TB líquido suplementado com 15µg/mL de cloranfenicol e crescidos a 30°C por 16 horas sob agitação constante. As culturas foram utilizadas para minipreparação de DNA, como já descrito anteriormente no item 3.1.6.

Como a clonagem é feita em vetor BAC, para a confirmação da sequência nucleotídica por sequenciamento, fez-se necessária a amplificação das regiões de interesse com enzima de alta fidelidade para um melhor resultado e qualidade da região sequenciada. Para tanto, foi feita a amplificação por PCR das regiões que abrangiam os fragmentos substituídos (Tabela 3.4), utilizando os kits comerciais *TripleMaster System* (Eppendorf) ou *LongRange PCR* (QIAGEN), seguindo instruções dos fabricantes, e foram submetidas aos seguintes ciclos: 93°C por 3 min., 40 ciclos de 93°C por 30 seg., 52°C por 30 seg. e 68°C por 4 min. Alíquotas de 10% da reação de PCR foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio. Para a purificação, os amplicons foram excisados de géis de agarose e purificados utilizando o kit comercial *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante e recuperados em 30µL de tampão EB fornecido no kit. Os clones E-402, NS3-209 e NS3-480 foram sequenciados no Instituto Carlos Chagas (ICC) usando *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os demais clones foram enviados para sequenciamento na MacroGen (Seoul, Coréia do Sul) (Quadro 3.5).

MUTAÇÃO	NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA*	TAMANHO FRAGMENTO
E402	PhD16+	5' CAG GAA GTA GTC GTA CTG GG 3'	positiva	1676 - 1695	1249pb
	CN5-	5' CCA TAT GTT TGT CGT G 3'	negativa	2908 - 2923	
	BACUSPT+	5' AGG AAA CGA CAG GTG CTG 3'	positiva	17704 - 17721	1823pb
	PhD15-	5' CCC AGT ACG ACT ACT TCC TG 3'	negativa	1676 - 1695	
	EcoNsi+	5' ATG CAT TGA AGC TA 3'	positiva	1111 - 1124	1308pb
	NarXho-	5' GTA CCT AGG AGT CAT GGT TCA AGC G 3'	negativa	2395 - 2419	
E405	D1+	5' GC GGC CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGT TGT TAG TCT ACG TGG 3'	positiva	17844 - 18	2.746pb
	D18-	5' TTC CTT GGG CCA AAA TTC C 3'	negativa	2702 - 2720	
NS3-209	PhD20+	5' GGG ACT TCG GCT CTA TAG GA 3'	positiva	2193 - 2212	3550pb
	CN20-	5' GTG ACA ACA TAG TCC CAG TC 3'	negativa	5722 - 5742	
NS3-435	D23+	5' GAA GGC GAA GTT GGA GCC 3'	positiva	4877 - 4894	1500pb
	Hel3'	5' TCT TCT TCC TGC TGC AAA CTC 3'	negativa	6356 - 6376	
NS3-480	CN10+	5' CCC GGC ACA TCT GGA TC 3'	positiva	4912 - 4929	2083pb
	D6-	5' TGT GTG TCT CAT CAT GGG 3'	negativa	6977 - 6994	

* Contando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR/90 (*GenBank* AF226685), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

Quadro 3.4 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de PCR dos possíveis clones recombinantes clonados em pBAC.

AMOSTRA	NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA*
E402 PCR PhD16+/CN5-	NarXho-	5' GTA CCT AGG AGT CAT GGT TCA AGC G 3'	negativa	2395 - 2419
	PhD20+	5' GGG ACT TCG GCT CTA TAG GA 3'	positiva	2193 - 2212
	PhD17-	5' GGG GAT CTT GCA TGG CGC A 3'	negativa	1924 - 1942
	D1 DomB+	5' ACG GGA TCC GTG ATG TGC ACA GGC TCA TTT 3'	positiva	1831 - 1852
	D1 DomB-	5' TGC GGT ACC GCT GCT TCC TTT CTT GAA CCA 3'	negativa	2105 - 2125
	CN5- D18-	5' CCA TAT GTT TGT CGT G 3' 5' TTC CTT GGG CCA AAA TTC C 3'	negativa negativa	2908 - 2923 2702 - 2720
E402 PCR BACUPS+/PhD15-	BACUPS+	5' AGG AAA CGA CAG GTG CTG 3'	positiva	17704 - 17721
	PhD15-	5' CCC AGT ACG ACT ACT TCC TG 3'	negativa	1676 - 1695
	EcoNsi+	5' ATG CAT TGA AGC TA 3'	positiva	1111 - 1124
	EcoApa-	5' CCT TGT GTT GGA CAT CTT GAA TCG GTG GTG G 3'	negativa	1137 - 1167
	M5'	5' GCGGATCCTCCGTGGCACTGGCCCCACAC 3'	positiva	701 - 730
	M3'	5' GGGAAAGTTTATAGGCCATTGATGGTGTACACAG 3'	negativa	914 - 933
	PhD5-	5' ATC ATG TGT GGC TCT CCC CCT CGT GTG GTC AAA 3'	negativa	442 - 474
	D1+	5' GC GGC CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGT TGT TAG TCT ACG TGG 3'	positiva	17844 - 18
	PhD7+	5' TCC GTG ACC ATG CTC CTC ATG 3'	positiva	395 - 415
E402 PCR EcoNsi+/NarXho-	EcoNsi+	5' ATG CAT TGA AGC TA 3'	positiva	1111 - 1124
	PhD15-	5' CCC AGT ACG ACT ACT TCC TG 3'	negativa	1676 - 1695
	PhD16+	5' CAG GAA GTA GTC GTA CTG GG 3'	positiva	1676 - 1695
	PhD17-	5' GGG GAT CTT GCA TGG CGC A 3'	negativa	1924 - 1942
	D1 DomB+	5' ACG GGA TCC GTG ATG TGC ACA GGC TCA TTT 3'	positiva	1831 - 1852
	D1 DomB- PhD20+	5' TGC GGT ACC GCT GCT TCC TTT CTT GAA CCA 3' 5' GGG ACT TCG GCT CTA TAG GA 3'	negativa positiva	2105 - 2125 2193 - 2212
E405 PCR D1+ / D18-	PhD20+	5' GGG ACT TCG GCT CTA TAG GA 3'	positiva	2193 - 2212
	PhD17-	5' GGG GAT CTT GCA TGG CGC A 3'	negativa	1924 - 1942
	D1E5' Eco	5' CAT GCG ATG CG 3'	positiva	934 - 944
	PhD5-	5' ATC ATG TGT GGC TCT CCC CCT CGT GTG GTC AAA 3'	negativa	442 - 474
	prM3	5' GGT GTC TCA AAG CCC AAG T 3'	negativa	809 - 827
	EcoApa-	5' CCT TGT GTT GGA CAT CTT GAA TCG GTG GTG G 3'	negativa	1137 - 1167
	D1 DomB+	5' TGT GAT GTG CAC AGG CTC ATT T 3'	positiva	1831 - 1852
	PhD15-	5' CCC AGT ACG ACT ACT TCC TG 3'	negativa	1676 - 1695
NS3-209 PCR PhD20+ / CN20-	PhD20+	5' GGG ACT TCG GCT CTA TAG GA 3'	positiva	2193 - 2212
	D3+	5' TCA AGG AGC ACG TCA CTT TCG 3'	positiva	2342 - 2362
	NS15'	5' GAC TCG GGA TGT GTA ATC AAC T 3'	positiva	2420 - 2441
	CN1+	5' GGC GTG TGT GGA ATT CGA 3'	positiva	2576 - 2593
	CN5-	5' CCA TAT GTT TGT CGT G 3'	negativa	2908 - 2923
	CN9-	5' GGT CTA ATT TCC ATG CC 3'	negativa	3413 - 3429
	NS13'	5' TGC AGA GAC CAT TGA CCT AAC 3'	negativa	3455 - 3475
	MF296-	5' TCC AGT CAT CAG CAT CTT TCT ACT CCA 3'	negativa	3554 - 3580
	CN2+	5' GCG TAT CAA TAA TGA TTG 3'	positiva	3516 - 3533
	CN13+	5' AGC ATC CAG AGA AGT TCT 3'	positiva	3763 - 3780
	CN13-	5' AGA ACT TCT CTG GAT GCT 3'	negativa	3763 - 3780
	NS2b+	5' AGT TGG CCC CTC AAT GAA GGA 3'	positiva	4130 - 4150
	D4-	5' CTC CAA TGA TAA ATC GGC 3'	negativa	4274 - 4291
	NS2b-	5' TCT CTG TTT CTT TTT CTG CCA 3'	negativa	4499 - 4519
	CN17-	5' GGG ACC TGC CCA ACA GTC CTC T 3'	negativa	4601 - 4622
	D23+	5' GAA GGC GAA GTT GGA GCC 3'	positiva	4877 - 4894
	CN11-	5' TGT CAC CAC TCC ATT TCC A 3'	negativa	4969 - 4987
	NS3PRO-	5' GTT TCT TTT CTT AAA CAC CTC GTC CTC 3'	negativa	5057 - 5083
	..28mer	5' CCT GTG TGC TCA CTC TTC ACT GCT GTT G 3'	negativa	5253 - 5280
	CN10+	5' CCC GGC ACA TCT GGA TC 3'	positiva	4912 - 4929
NS3-435 PCR D23+ / Hel3'	CN20-	5' GTG ACA ACA TAG TCC CAG TC 3'	negativa	5722 - 5742
	CN14+	5' GGA AAT GAC ATT GCC AAC TG 3'	positiva	5624 - 5647
	CN10+	5' CCC GGC ACA TCT GGA TC 3'	positiva	4912 - 4929
	+28mer	5' GAT ATC TTC CAG CCA TAG TCC GTG AGG CC 3'	positiva	5127 - 5155
NS3-480 PCR CN10+ / D6-	CN10+	5' CCC GGC ACA TCT GGA TC 3'	positiva	4912 - 4929
	+28mer	5' GAT ATC TTC CAG CCA TAG TCC GTG AGG CC 3'	positiva	5127 - 5155
	CN20-	5' GTG ACA ACA TAG TCC CAG TC 3'	negativa	5722 - 5742
	CN14+	5' GGA AAT GAC ATT GCC AAC TG 3'	positiva	5624 - 5647
	CN18+	5' CAC ACC AGA AGG GAT CAT CCC AG 3'	positiva	6019 - 6041
	CN40+	5' GAT CCA CTG GCC CTG CGC GAG 3'	positiva	6329 - 6349
	Hel3'	5' TCT TCT TCC TGC TGC AAA CTC 3'	negativa	6356 - 6376
	CN38+	5' GAC GCT AAG AGC CCA GAA TGC TCT GG 3'	positiva	6427 - 6452
	CN21-	5' CGGCTACATGGCCAATCCCC 3'	negativa	6865 - 6884

* Contando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR/90 (*GenBank* AF226685), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

Quadro 3.5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento dos PCR dos possíveis clones recombinantes clonados em pBAC.

3.1.11 Construção de clones recombinantes – duplos e triplo mutantes

Os clones duplos e triplo mutantes foram construídos com a combinação das mutações localizadas nas proteínas E e NS3, de cada vírus neuroadaptado (Quadro 1.1, item 1.5.1). A construção foi feita a partir dos clones contendo uma única mutação, confirmados por sequenciamento, onde foi clonada a segunda mutação. A substituição do novo fragmento mutado foi feita com os fragmentos liberados dos clones em *pGEM-T Easy* ou dos clones em pBACDV1 com sua sequência confirmada.

Para tanto, foram construídos os seguintes clones:

- E405/NS3-435: contém as duas mutações do vírus FGA/NA-d1d, e foi construído pela inserção do fragmento NS3-435, liberado do clone em NS3-435pGEM, no clone E405pBAC, que foram digeridos com as enzimas BsiWI 10U/μL e RsrII 5U/μL (New England Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas.
- E402/NS3-209: contém a combinação de duas mutações do vírus FGA/NA-P6, e foi construído pela inserção do fragmento mutado NS3-209, liberado do clone em NS3-209pBAC, no clone E402pBAC, que foram digeridos com as enzimas MluI 10U/μL e BsiWI 10U/μL (New England Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas.
- E402/NS3-480: contém a combinação de duas mutações do vírus FGA/NA-P6, e foi construído pela inserção do fragmento mutado NS3-480, liberado do clone em NS3-480pBAC, no clone E402pBAC, que foram digeridos com as enzimas BsiWI 10U/μL e NheI 10U/μL (New England Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas.
- E402/NS3-209/NS3-480: contém a a combinação das três mutações encontradas no vírus FGA/NA-P6, e foi construído pela inserção do fragmento mutado NS3-480, amplificado por PCR de fusão, no clone E402/NS3-209, que foram digeridos com as enzimas BsiWI 10U/μL e NheI 10U/μL (New England

Biolabs), de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas.

Os novos clones recombinantes, duplos e triplo mutantes, seguiram os mesmos protocolos e condições dos clones contendo uma única mutação para construção, confirmação de clones (Quadro 3.6), sequenciamento, amplificação e análise dos vírus recombinantes.

CLONE	PCR	NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA*	TAMANHO FRAGMENTO
E405 NS3-435	1	D23+	5' GAA GGC GAA GTT GGA GCC 3'	positiva	4877 - 4894	1.500pb
		Hel3'	5' TCT TCT TCC TGC TGC AAA CTC 3'	negativa	6356 - 6376	
E402/NS3-209	1	D1+	5' GC GGC CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGT TGT TAG TCT ACG TGG 3'	positiva	17844 - 18	2.746pb
		D18-	5' TTC CTT GGG CCA AAA TTC C 3'	negativa	2702 - 2720	
	2	NS15'	5' CGG GAT CCG ACT CGG GAT GCG TAA TCA AC 3'	positiva	2420 - 2441	1.871pb
		D4-	5' CTC CAA TGA TAA ATC GGC 3'	negativa	4274 - 4291	
	3	D13+	5' GGC TAT GGT ACT GTC AAT CGT 3'	positiva	3979 - 3999	1.302pb
		-28mer	5' GGC GAT CTC CTG TGT GTT CAC TCT TCA CTG CTG TTG 3'	negativa	5253 - 5280	
E402/NS3-480	1	D1+	5' GC GGC CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGT TGT TAG TCT ACG TGG 3'	positiva	17844 - 18	2.746pb
		D18-	5' TTC CTT GGG CCA AAA TTC C 3'	negativa	2702 - 2720	
	2	D23+	5' GAA GGC GAA GTT GGA GCC 3'	positiva	4877 - 4894	2.007pb
		CN21-	5' CGG CGG CTA CAT GGC CAA TCC C 3'	negativa	6865 - 6884	
E402 NS3-209 NS3-480	1	D23+	5' GAA GGC GAA GTT GGA GCC 3'	positiva	4877 - 4894	2.118pb
		D6-	5' TGT GTG TCT CAT CAT GGG 3'	negativa	6977 - 6994	

* Contando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR/90 (*GenBank* AF226685), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

Quadro 3.6 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos PCR dos possíveis clones, duplos e triplo mutante, para confirmação por sequenciamento.

3.2. Geração de vírus recombinantes

3.2.1 Linearização dos clones recombinantes por digestão

Um clone de cada estratégia de construção, todos confirmados por sequenciamento, foram selecionados para prosseguir para as próximas etapas.

As minipreparações foram linearizadas pela digestão com a enzima de restrição *SwaI* 10U/μL, de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante das enzimas. A reação foi incubada a 25°C por 16 horas. O fragmento gerado está representado na Figura 3.8.

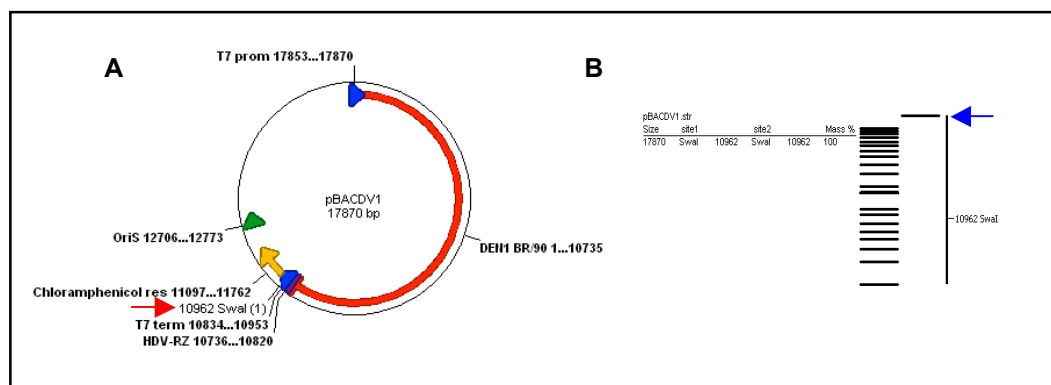


Figura 3.8 – Representação esquemática da digestão do clone pBACDV1 com enzimas de restrição Swal. Em **A**, a representação do mapa do plasmídeo, destacando a localização do sítio da enzima (seta vermelha), em **B**, o perfil do fragmento gerado pela digestão, apontado pela seta azul.

A purificação da digestão foi feita com reagentes livres de nucleases, e foram adicionados 12µL 1M NaCl, 1µL SDS10%, 2µL 0.5M EDTA e 1µL de glicogênio de ostra (10mg/mL) em cada tubo. As amostras foram extraídas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e a mistura foi precipitada com 3 volumes de etanol absoluto, a -20°C por 16 horas. Após este período, o material foi centrifugado a 16.000xg por 15 min. a 4°C , lavado com etanol 70% e centrifugado novamente por 10 min. O DNA foi recuperado em 5µL de água livre de nucleases, fornecida no kit de transcrição *in vitro*.

3.2.2 Transcrição *in vitro*

O DNA linearizado e purificado foi utilizado como molde para a reação de transcrição *in vitro*, utilizando o kit comercial *T7 MEGAscript High Yield Transcription* (AMBION). A reação foi composta por 2,5µL do DNA linearizado e purificado, 1µL de tampão de reação 10x, 1µL de ATP, 1µL de CTP, 1µL de UTP, 0,5µL de GTP, 1µL de $m^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{G RNA Cap Structure Analog}$ (New England Biolabs), 1µL de água livre de nucleases e 1µL de T7 RNA polimerase, e foi incubada a 38°C por 3 horas.

Alíquotas de 5% da reação de transcrição foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio, livres de nucleases.

3.2.3 Determinação da linhagem celular e método de transfecção

Para determinar a melhor linhagem celular para o estudo, células de inseto C6/36 (glândula salivar de mosquito *Aedes albopictus*) e células de mamífero BHK-21 (*baby hamster kidney*) foram testadas em diferentes condições de transfecção. O método de transfecção do RNA também foi avaliado quanto à sua eficácia e rendimento. Foram testados os protocolos de eletroporação e transfecção por lipossomos.

3.2.3.1 Eletroporação

Culturas de células C6/36 e BHK-21 com 60% de confluência em garrafa T150 (TPP) foram utilizadas para o teste de eletroporação. As monocamadas de células foram destacadas das garrafas, por raspagem física para C6/36 e pela ação da tripsina para BHK-21, centrifugadas a 4°C e lavadas com 1xPBS gelado, por três vezes. As células eram contadas em câmara de Neubauer e recuperadas em 1xPBS gelado para 2×10^6 células/mL. Uma quantidade de 8×10^5 células foi eletroporada com o RNA do clone pBACDV1, nas seguintes condições: 2 pulsos de 750V, capacitância 25µF e resistência ∞ . Após o choque, as células foram incubadas por 5 min. a temperatura ambiente e, em seguida, adicionadas a 10mL de meio de cultura específico e distribuídas em placas de 4 poços (TPP). As placas foram incubadas por 4 horas e o meio substituído em seguida. Os sobrenadantes foram recolhidos nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas pós eletroporação, aliquotados e armazenados a -70°C para posterior titulação.

3.2.3.2 Transfecção por lipossomos

Células C6/36 (1×10^5 células/poço) e BHK-21 (5×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 4 poços (TPP) para transfecção do RNA pBACDV1. Foram utilizadas 2,5µg de lipofectina (Invitrogen) para cada poço, que era misturada com meio OptiMEM (GIBCO/Invitrogen) e incubada a temperatura ambiente por 30 min. As células foram lavadas uma vez com 1mL de OptiMEM e os RNAs misturados com o mesmo meio, em um novo tubo mantido em gelo. O meio das células era então removido, a mistura meio/lipofectina era distribuída nos tubos contendo RNA/meio e a combinação lipofectina/RNA/meio era adicionada aos poços contendo as células. As placas foram incubadas a 28°C (para C6/36) e 37°C (para BHK), por 3 horas para adsorção do RNA. Após este período, o inóculo foi substituído por 1,5mL de meio correspondente, e a cultura mantida em temperatura adequada até o momento de seu recolhimento. Os sobrenadantes foram recolhidos nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção, aliquotados e armazenados a -70°C para posterior titulação.

3.2.4 Transfecção de RNA recombinante em células de inseto C6/36

A metodologia escolhida para a transfecção dos RNAs foi o protocolo por lipossomos. Os RNAs recombinantes resultantes das transcrições *in vitro* (item 3.2.2) foram utilizados para transfectar células de inseto C6/36, utilizando o protocolo da lipofectina, como descrito acima (item 3.2.3.2).

3.2.5 Titulação viral por imunodeteção de foco

A presença de partículas virais no sobrenadante das transfecções foi avaliada através da técnica de titulação viral por imunodeteção de foco. Foi utilizada uma quantidade de 1×10^5 células C6/36 por poço, semeadas em placas de 24 poços

(TPP). As células eram infectadas com 400µL de diluições seriadas (1:10) dos sobrenadantes em meio L15 (Leibovitz L-15) suplementado com 0,26% de triptose (Sigma) e 25µg/mL de solução de gentamicina (GIBCO/Invitrogen), denominado L15 sem soro. O inóculo foi incubado, em duplicata, com as células por 1h a 28°C e, em seguida, substituído por uma mistura (1:2) de meio de cultura L15 completo suplementado com 10% de SFB e solução 3,2% Carboxi Metil Celulose (CMC) (Sigma). As placas eram seladas com fita e incubadas em estufa a 28°C por 7 dias. Para a revelação dos focos de infecção, as células foram lavadas com solução 1xPBS para a completa remoção do CMC, fixadas com solução 3% paraformaldeído (Sigma) por 20 min. a temperatura ambiente, permeabilizadas com 0,5% Triton X-100 (Sigma) por 4 min. a temperatura ambiente, lavadas três vezes com solução 1xPBS e incubadas com anticorpo monoclonal anti-E, 4G2 flavivirus-específico, diluído 1:200 em solução 1xPBS, por 1h a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas novamente com 1xPBS e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega), diluído 1:10.000 em solução 1xPBS por 1 hora a 37°C. Após a reação com o anticorpo secundário, as células foram novamente lavadas com 1xPBS e a reação foi revelada pela adição dos substratos da enzima (BCIP e NBT, 50mg/mL, Promega) diluídos em tampão fosfatase alcalina (*AP buffer*), por 30 min. sob agitação leve e constante, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O título viral é expresso em unidades formadoras de foco por mL (ffu/mL) que é determinado pela fórmula abaixo:

$$\frac{\text{média número de focos (duplicata)}}{\text{vol inóculo}} \times \text{diluição} \times \frac{1}{\text{vol inóculo}} = \text{título viral (ffu/mL)}$$

3.2.6 Amplificação de estoques virais em cultura de células de inseto

A fim de amplificar o estoque viral das amostras transfectadas, gerando quantidades suficientes de vírus de mesmo lote para utilização em todos os experimentos subsequentes, foram feitas duas passagens subsequentes em células de inseto (C6/36), a partir do sobrenadante recolhido após a transfecção.

Para essas passagens, células C6/36 foram infectadas com esses sobrenadantes em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.01. O inóculo foi incubado com as células por 1h a 28°C e, em seguida, substituído por meio L15 completo. As infecções eram acompanhadas por 5 a 7 dias, até o aparecimento de efeito citopático. As culturas eram recuperadas por raspagem, transferidas para tubos e centrifugadas a 480xg, por 10 min., a 4°C em centrífuga Sorvall Super T21. Os sedimentos de células eram então separados dos sobrenadantes, que eram aliquotados em tubos de 1.5mL, no caso da primeira passagem, ou utilizados para purificação dos vírus por gradiente de sacarose, no caso da segunda passagem. Todo o material era estocado a -70°C e a presença de partículas virais nos sobrenadantes foi avaliada através da técnica de titulação viral por imunodeteção de foco, exatamente como descrito no item 3.2.5.

3.2.7 Purificação viral em gradiente de sacarose

A fim de se obter estoques virais purificados e concentrados, os sobrenadantes das culturas da segunda passagem foram precipitados com 7% de polietileno glicol (PEG P.M. 8.000) e 2,3% NaCl, sob agitação leve e constante, por 16 horas a 4°C. Após este período, as culturas precipitadas foram centrifugadas a 12.000xg, por 30 min., a 4°C em centrífuga Sorvall Super T21. Os sedimentos contendo as partículas virais foram ressuspensos em 3mL de tampão TNE (50mM Tris (pH7.5), 100mM NaCl, 1mM EDTA) e adicionados sobre gradientes descontínuos de sacarose 60% e 30% (preparada no mesmo tampão). O material foi centrifugado em ultracentrífuga (Itachi) a 250.000xg, por 2 a 3 horas. Após a ultracentrifugação, as bandas contendo os vírus concentrados eram visualizadas com o auxílio de um anteparo escuro, coletadas com pipetas Pasteur descartáveis, aliquotadas e armazenadas a -70°C. A quantificação das partículas virais nos sobrenadantes precipitados e purificados foi avaliada através da técnica de titulação viral por imunodeteção de foco, exatamente como descrito no item 3.2.5.

É importante ressaltar que o genoma infeccioso, pBACDV1, e o controle negativo, *mock*, foram igualmente processados com os mesmos critérios de passagem em cultura de células e purificação por gradiente de sacarose, e foram

utilizados como parâmetros de controle nos experimentos de infecção celular e posteriormente, nos experimentos de inoculação em camundongos, para assegurar a infectividade e letalidade dos vírus recombinantes.

3.2.8 Sequenciamento completo dos vírus recombinantes

Para a confirmação da sequência nucleotídica completa dos vírus recombinantes amplificados e concentrados, 100µL de vírus purificado por gradiente foram utilizados para extração de RNA utilizando o kit comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN), seguindo recomendações do fabricante, e eluídos em 60µL de tampão AVE fornecido pelo kit.

O RNA viral foi convertido em cópia complementar de DNA (cDNA) utilizando o kit *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega) e o oligonucleotídeo iniciador *Random Primer* (100pmol/µL – Invitrogen), seguindo especificações do kit.

Os cDNAs foram utilizados como molde para amplificação, por PCR, de seis ou sete fragmentos que cobriam o genoma inteiro do vírus, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Quadro 3.7).

PCR	NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA*	TAMANHO FRAGMENTO
1	D1USA +	5' GC GGC CGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGT TGT TAG TCT ACG TGG 3'	positiva	17844 - 18	2.121 pb
	D1 DomB-	5' TGC GGT ACC GCT GCT TCC TTT CTT GAA CCA 3'	negativa	2105 - 2125	
2	D1 DomB+	5' ACG GGA TCC GTG ATG TGC ACA GGC TCA TTT 3'	positiva	1831 - 1852	1.954 pb
	CN13-	5' GAA GAA CCT CTC TGG ATG 3'	negativa	3763 - 3780	
3	CN2+	5' GCG TAT CAA TAA TGA TTG 3'	positiva	3516 - 3533	2.227 pb
	CN20-	5' GTG ACA ACA TAG TCC CAG TC 3'	negativa	5722 - 5742	
4	+28mer	5' CCG CTC GAG ATA TCT TCC AGC CAT AGT CCG TGA GGC 3'	positiva	5127 - 5155	1.758 pb
	CN21-	5' CGG CGG CTA CAT GGC CAA TCC C 3'	negativa	6865 - 6884	
5	CN38+	5' GAC GCT AAG AGC CCA GAA TGC TCT GG 3'	positiva	6427 - 6452	2.546 pb
	D8-	5' TGC CTT TCC AAA CTC TCC 3'	negativa	8957 - 8974	
6a	D15+	5' GCA AAA CGA GGC ACA GCA 3'	positiva	8666 - 8683	2.070 pb
	D10 -	5' CCG CTC GAG GCT CTT CGA GAA CCT GTT GAT TCA ACA GC 3'	negativa	10715 - 10735	
6b	D15+	5' GCA AAA CGA GGC ACA GCA 3'	positiva	8666 - 8683	1.351 pb
	CN16-	5' CCC TAT TCC ACA CTG 3'	negativa	10002 - 10016	
7	CN33+	5' GGA GAG ACC TGA GAC TAG CGG C 3'	positiva	9875 - 9897	860 pb
	D10 -	5' CCG CTC GAG GCT CTT CGA GAA CCT GTT GAT TCA ACA GC 3'	negativa	10715 - 10735	

* Contando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR/90 (*GenBank* AF226685), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

Quadro 3.7 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação por PCR do genoma completo dos clones a partir do RNA dos vírus purificados por gradiente de sacarose.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit comercial *LongRange PCR* (QIAgen), seguindo instruções do fabricante, e foram submetidas aos seguintes ciclos: 93°C por 5 min., 40 ciclos de 93°C por 30 seg., 52°C por 30 seg. e 68°C por 4 min. Alíquotas de 10% da reação de PCR foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio. Para a purificação, os amplicons foram excisados de géis de agarose e purificados utilizando o kit comercial *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAgen), seguindo instruções do fabricante e recuperados em 30 a 60µL de tampão EB fornecido no kit.

Os fragmentos e os oligonucleotídeos iniciadores específicos (Quadro 3.8) foram enviados para sequenciamento na MacroGen (Seoul, Coréia do Sul). As seqüências nucleotídicas foram analisadas através do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (www.phrap.org). O software CLUSTALx (HIGGINS; SHARP, 1988) foi utilizado para alinhar as seqüências e o software GENEDOC (NICHOLAS; NICHOLAS JR; DEERFIELD, 1997) para visualizar as diferenças de nucleotídeos e aminoácidos entre os vírus mutados.

NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA*
D1USA +	5' GCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGAGTTGTTAGTCTACGTGG 3'	positiva	5'UTR 17844 - 18
phD5 -	5' TATCATGTGTGGAATTCAGCCACGTGTGGTCAA 3'	negativa	prM 442 - 474
M5'	5' GCGGATCCTCCGTGGCACTGGCCCCACAC 3'	positiva	prM 701 - 730
M3'	5' GGGAAGGTTTTAGGCCATTGATGGTGTCACCAG 3'	negativa	prM 914 - 933
EcoNsi +	5' ATGCATTGAAGCTA 3'	positiva	E 1111 - 1124
CN41 -	5' CCTTGTGTGGACATCTTGAATCGGTGGTGG 3'	negativa	E 1137 - 1167
phD15 -	5' CTAGTACGACTACTTCCTG 3'	negativa	E 1676 - 1695
DomB +	5' ACGGGATCCGTGATGTGCACAGGCTCATTT 3'	positiva	E 1831 - 1852
phD17 -	5' GGGATCTTGCATGGTGC 3'	negativa	E 1924 - 1942
DomB -	5' TGCGGTACCGCTGCTTCTTTCTTGAACCA 3'	negativa	E 2105 - 2125
phD20 +	5' GACTTCGGTCTTATAGG 3'	positiva	E 2193 - 2212
NarXho -	5' GTACCTAGGAGTCATGGTCAAGCG 3'	negativa	E 2395 - 2419
NS1 5'	5' CGGGATCCGACTCGGGATGCGTAATCAAC 3'	positiva	NS1 2420 - 2441
CN1 +	5' GCGTGTGTGGAATTCG 3'	positiva	NS1 2576 - 2593
CN42 +	5' CCCAAATGTGTGACCAACCGGC 3'	positiva	NS1 2946 - 2966
CN9 -	5' GTCTGATTTCCATGCCG 3'	negativa	NS1 3413 - 3429
NS1 3'	5' GGGAAGCTTTTATGAGAGACATTGACCTAAC 3'	negativa	NS1 3455 - 3475
CN2 +	5' GCGTATCAATAATGATTG 3'	positiva	NS2a 3516 - 3533
CN13 -	5' GAAGAACCTCTCTGGATG 3'	negativa	NS2a 3763 - 3780
D13 +	5' GGCTATGGTACTGTCAATCGT 3'	positiva	NS2a 3979 - 3999
D4 -	5' CTCCAATGATAAATCGGC 3'	negativa	NS2b 4274 - 4291
NS2b -	5' CCCAAGCTTTCATCTCTGTTTTCTTTTCTGCCA 3'	negativa	NS2b 4499 - 4519
D23 +	5' GAAGCGAAGTTGGAGCC 3'	positiva	NS3 4877 - 4894
CN11 -	5' GTCACCACTCCATTCC 3'	negativa	NS3 4969 - 4987
+ 28mer	5' CCGCTCGAGATATCTCCAGCCATAGTCCGTGAGGC 3'	positiva	NS3 5127 - 5155
- 28mer	5' GGCGATCTCCTGTGTGTTCACTCTTCACTGCTGTTG 3'	negativa	NS3 5253 - 5280
CN14 +	5' GGAAATGACATTGCCAACTG 3'	positiva	NS3 5624 - 5647
CN20 -	5' GTGACAACATAGTCCCAGTC 3'	negativa	NS3 5722 - 5742
CN18 +	5' CACACCAGAAGGGATCATCCC 3'	positiva	NS3 6019 - 6041
CN40 +	5' GATCCACTGGCCCTGCGCGAG 3'	positiva	NS3 6329 - 6349
D19 +	5' CAGCGCACTCCACAGGAC 3'	positiva	NS4a 6752 - 6769
CN21 -	5' CGGCGGTACATGGCCAATCCC 3'	negativa	NS4b 6865 - 6884
CN34 +	5' GACACTGACAGCGGCGGTGTTG 3'	positiva	NS4b 7144 - 7168
CN35 -	5' GGGTCCAGTAGCCAGTGTGATC 3'	negativa	NS4b 7408 - 7428
CN23 +	5' GACAGACTGAACCAACTGAGC 3'	positiva	NS5 7617 - 7637
CN25 +	5' GGCTTAGAGGAAACCAATTCTGC 3'	positiva	NS5 8084 - 8107
D15 +	5' GCAAAACGAGGCACAGCA 3'	positiva	NS5 8666 - 8683
CN37 -	5' CCACTTGGCTGTACCTC 3'	negativa	NS5 8692 - 8710
D8 -	5' CGGCTCGAGTGCCCTTTCCAAACTCTCC 3'	negativa	NS5 8957 - 8974
CN32 +	5' GACATCATGGAGCCTGAACATGC 3'	positiva	NS5 9233 - 9255
CN19 -	5' GACAGGTTGCAACAGCC 3'	negativa	NS5 9584 - 9601
CS2 +	5' CGCACAACTGGTCAATCCATGCCAC 3'	positiva	NS5 9955 - 9966
CN16 -	5' CAGTGTTGAATAGGG 3'	negativa	NS5 10002 - 10016
CN15 -	5' CTGCCTGTGGCTCCATCGTGGGA 3'	negativa	3'UTR 10433 - 10455
D10 -	5' CCGCTCGAGGCTCTTCGAGAAGCTGTTGATTCAACAGC 3'	negativa	3'UTR 10715 - 10735

* Contando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR/90 (*GenBank* AF226685), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

Quadro 3.8 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento do genoma completo dos clones a partir das amplificações por PCRs dos vírus purificados em gradiente de sacarose.

3.3. Análise *in vitro* dos vírus recombinantes

3.3.1 Análise comparativa do efeito citopático dos vírus recombinantes e controles em cultura de células de inseto C6/36

Para a análise do efeito citopático dos vírus recombinantes, foi utilizada uma quantidade de 5×10^5 células C6/36, semeadas em uma garrafa T25 (TPP) por amostra. As células eram infectadas com MOI de 0.01 dos sobrenadantes purificados por gradiente de sacarose, diluídos em meio L15 sem soro para volume final de 1mL. Para uma análise comparativa, além dos vírus recombinantes, foram realizadas infecções em paralelo com vírus gerados a partir do genoma infeccioso pBACDV1, os vírus neuroadaptados FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6 e o controle negativo (*mock*). O inóculo foi incubado com as células por 1h a 28°C e, em seguida, substituído por 5mL de meio L15 completo. As infecções eram acompanhadas por até 7 dpi e o efeito citopático era observado nos dias 5, 6 e 7 dpi, com microscópio invertido Nikon Eclipse TE300 e fotografado para registro.

3.3.2 Imunofluorescência indireta de cultura de células de inseto C6/36 com os vírus recombinantes e controles

Para a análise comparativa da infecção com os vírus recombinantes por imunofluorescência, foi utilizada uma quantidade de 1×10^5 células C6/36, semeadas em quatro placas de 24 poços (TPP). A monocamada de células era infectada com MOI de 0.01 dos sobrenadantes purificados por gradiente de sacarose, diluídos em meio L15 sem soro para volume final de 500µL por poço. Para uma análise comparativa, além dos vírus recombinantes, foram realizadas infecções em paralelo com vírus gerados a partir do genoma infeccioso pBACDV1 e o controle negativo (*mock*). O inóculo foi incubado em duplicata com as células por 1h a 28°C e, em seguida, substituído por 1,5mL de meio L15 completo. As placas eram seladas com fita e incubadas em estufa a 28°C por 5 e 7 dias.

Para a reação de imunofluorescência, duas placas foram fixadas com 5 dpi e, outras duas, com 7dpi. Os sobrenadantes foram retirados e descartados, e as células fixadas em solução acetona/metanol (1:1) por 1 hora e meia, a -20°C . Após este período, a solução de fixação era descartada e uma placa era reagida com anticorpo monoclonal anti-E, 4G2 flavivirus-específico, diluído 1:100 em solução 1xPBS, e outra placa, com sobrenadante de cultura de um hibridoma secretor de anticorpo monoclonal anti-helicase DENV1, 1402-7B. As placas eram incubadas a 37°C por 1h. Em seguida, as células foram lavadas novamente com 1xPBS e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Gibco-BRL), diluído 1:300 em solução 1xPBS contendo $3\mu\text{L/mL}$ de Azul de Evans 1%, por 1 hora a 37°C . Após a reação com o anticorpo secundário, as células foram novamente lavadas com 1xPBS e incubadas com DAPI (Sigma), diluído 1:2.000 em solução 1xPBS, por 5 min., a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As células foram, então, abundantemente lavadas com 1xPBS, a solução de lavagem foi completamente evaporada e foram adicionados $200\mu\text{L}$ de solução 1xPBS contendo 10% glicerol para proceder a visualização e fotodocumentação com microscópio invertido de fluorescência Nikon Eclipse TE300.

3.4. Análise *in vivo* dos vírus recombinantes

3.4.1 Inoculação de camundongos – ensaio de DL_{50} do genoma infeccioso pBACDV1 e infecção com vírus recombinantes e controles

Os vírus recombinantes purificados por gradiente de sacarose foram utilizados para inoculação via intracerebral (i.c.) (GOULD; CLEGG, 1985) em camundongos *Swiss* neonatos (até 48h após o nascimento). A dose viral estabelecida para inoculação com os vírus recombinantes foi 10^{-2} ffu (dois logs a menos) de 50% da dose letal (DL_{50}) (DESPRÈS *et al.* 1998). Para determinar essa dose foi utilizado o vírus gerado a partir do genoma infeccioso pBACDV1. Quatro grupos de animais (entre 7 e 10 filhotes) foram inoculados com as doses de 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 ffu e um grupo de animais (10 filhotes) foi inoculado com o controle negativo, *mock*. Os animais foram acompanhados por 21 dias para observação de

morbidade e mortalidade. A dose viral correspondente a DL_{50} foi estabelecida através de cálculo, conforme fórmula abaixo, baseando-se nos resultados de mortalidade obtidos para as diferentes doses testadas.

$$DL_{50} = \frac{\% \text{ dos animais mortos na próxima diluição que matou acima de } 50\% - 50}{\% \text{ dos animais mortos na próxima diluição que matou acima de } 50\% - \% \text{ dos animais mortos na próxima diluição que matou abaixo de } 50\%}$$

Cada vírus recombinante, o vírus parental (gerado a partir do genoma infeccioso pBACDV1), o *mock* e os vírus neuroadaptados FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6, todos purificados em gradiente de sacarose, foram diluídos em meio de cultura celular L15 sem soro para uma concentração de $1 \times 10^{2,75}$ ffu e inoculados via i.c. em grupos de camundongos neonatos (40µL por animal). Todos os inóculos foram feitos em triplicata e os animais foram observados por 21 dias para análise do aparecimento dos sinais de encefalite e morte. Oito dias pós-inoculação (dpi), três animais de cada grupo eram sacrificados por anóxia, utilizando CO_2 , para a coleta do tecido cerebral. Os tecidos cerebrais dos animais sacrificados (*pool* de três animais) foram homogeneizados, pesados e utilizados para a extração do RNA viral. Outro animal de cada grupo foi sacrificado no décimo dpi, da mesma maneira descrita anteriormente, e os tecidos cerebrais foram fixados em solução de 10% formalina e utilizados para ensaios de histopatologia.

Todo o manejo dos animais infectados foi realizado em câmara de segurança nível 2. Os animais eram mantidos em gaiolas isoladas com filtros de ar, com comida, água *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12 horas. As gaiolas eram forradas de cepilho, sendo a troca de cama e a higienização das caixas realizadas duas vezes por semana. Os camundongos eram sacrificados, utilizando-se câmara de CO_2 . Os experimentos com animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Paraná (CEP/UFPR 23075-0429663/2007-97).

3.4.2 Extração RNA de tecido cerebral infectado com vírus recombinantes e controles

O RNA total foi extraído a partir de 30mg de tecido cerebral macerado de um *pool* de três camundongos 8 dpi, utilizando o kit comercial *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante, eluído em 60µL de tampão de eluição fornecido pelo kit e mantido a -70°C.

3.4.3 Avaliação de possível contaminação com vírus da encefalomielite murina de Theiler no sistema nervoso central de camundongos por PCR em tempo real

O vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) é um patógeno entérico de camundongos, pertencente ao gênero *Cardiovirus* da família *Picornaviridae* (RUECKERT, 1996), que possui cepas neurovirulentas (GDVII e FA) que induzem uma encefalite aguda e fatal, e cepas de baixa virulência (TO, WW, DA e BeAn) que persistem no sistema nervoso central, induzindo doença crônica, caracterizada por desmielinização (LIPTON, 1975).

Com a finalidade de descartar uma possível contaminação das ninhadas com TMEV, tendo em vista que os sinais de encefalite dos animais infectados com TMEV são semelhantes aos sintomas dos animais inoculados com os vírus dengue mutados e neuroadaptados, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), de acordo com o protocolo de Jin *et al.* (2007).

Para tanto, 4µg do RNA total extraído de cada cérebro infectado (item 4.2) foi submetido a uma reação de transcrição reversa (cDNA) utilizando o kit *Impron II Reverse Transscriptase* (Promega), seguindo recomendações do fabricante, contendo 20µM do oligonucleotídeo iniciador oligo(dT) e a reação foi incubada a 42°C por 2 horas. Após o término da reação, as amostras foram diluídas para concentração final de 2ng/µL com água livre de RNases. O cDNA resultante foi utilizado na reação de qPCR com 100nM dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (Quadro 3.9) e *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) conforme

recomendação do fabricante. Nesse protocolo foram utilizadas as seguintes condições de temperatura: 50°C por 2 min., 95°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min., em um *ABI PRISM 7500 Detection System* (Applied Biosystem). Curvas de dissociação foram utilizadas para verificar a especificidade do produto e consistiu de uma incubação em que temperatura foi aumentada de 60°C a 96°C numa taxa de aproximadamente 1°C/40 seg., com leitura contínua da fluorescência.

3.4.4 Análise da replicação viral dos vírus dengue recombinantes e controles no sistema nervoso central de camundongos por PCR em tempo real

Para quantificar o RNA viral presente no tecido cerebral de camundongos infectados com os vírus recombinantes e controles, foi realizada uma reação de qRT/PCR, de acordo com o protocolo descrito por Poersch *et al.*, (2005).

A qRT/PCR foi realizada no *ABI PRISM 7500 Detection System* (Applied Biosystem). O RNA total extraído dos tecidos cerebrais (item 4.2) foi utilizado na reação contendo a concentração recomendada de *MultiScribe Enzyme plus RNase Inhibitor* e *TaqMan Universal RT-PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 400nM dos oligonucleotídeos específicos para DENV1 e 300nM da sonda específica para DENV1 (Quadro 3.9). As condições de temperatura foram: 1 ciclo de 48°C por 30 min. e 1 ciclo de 95°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min.

Os dados da amplificação do RNA viral por qRT/PCR foram normalizados, utilizando o gene de expressão constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Mus musculus* (*murGAPDH*). Para tanto, o RNA de cada vírus recombinante e controles foi submetido a uma reação de transcrição reversa (cDNA) conforme descrito no item 3.4.3. O cDNA resultante foi utilizado na reação de qPCR com 250nM dos oligonucleotídeos iniciadores específicos de *murGAPDH* e *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante, e submetidas às seguintes condições de temperatura: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg. e 62°C por 30 seg. A curva de dissociação foi utilizada para verificar a especificidade do produto.

ALVO	NOMENCLATURA OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA*	AMPLICON
THEILER	THVF	5' CCC AGT CCT CAG GAA ATG AAG G 3'	positiva	- 1326 - 1347	183pb
	THVR	5' TCC AAA AGG AGA GGT GCC ATA G 3'	negativa	- 1488 - 1509	
DENV1	DEN1F	5' GCT GAT GCT GGT GAC ACC AT 3'	positiva	prM 907 - 926	65pb
	DEN1R	5' TCG ACG AAG TCT CTG TTG CCT AT 3'	negativa	E 950 - 972	
	DEN1P	5' (FAM) CCC ACG CAT CGC ATG GCC AT (TAMRA) 3'	sonda	prM/E 929 - 948	
murGAPDH	GAPDHF	5' CGA CTT CAA CAG CAA CTC CCA CTC 3'	positiva	- -	278pb
	GAPDHR	5' CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA TTC 3'	negativa	- -	

Quadro 3.9 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reações de amplificação por qPCR.

3.4.5 Análise do perfil da expressão gênica no sistema nervoso central de camundongos infectados com vírus recombinantes e controles por PCR em tempo real

Baseando-se em dados anteriores do grupo (BORDIGNON *et al.*, 2008), que mostram o perfil da expressão gênica em vias diferencialmente expressas durante a infecção do SNC de camundongos com cepas neurovirulentas, foram escolhidos 7 genes (Quadro 3.10) para análise por qPCR do perfil da expressão gênica no tecido cerebral dos camundongos infectados com os vírus recombinantes e controles.

GENE	Entrez GeneID	Via de expressão gênica
GAPDH	14433	normalizador
Irf1	16362	sinalização de interferon
Psmb8	16913	apresentação de antígeno
Usp18	24110	ubiquitinação
C1r	50909	complemento
IFNα	15964	interferon
IFNβ	15977	interferon
Ccl5	20304	quimiocina

Quadro 3.10 – Identificação dos genes e vias escolhidas para o estudo do perfil da expressão gênica no tecido cerebral de camundongos infectados com os vírus recombinantes e controles.

Para tanto, 4µg do RNA total extraído de cada cérebro infectado foi submetido a uma reação de transcrição reversa (cDNA), conforme descrito no item 3.4.3. Após o término da reação, as amostras foram diluídas para concentração final de 2ng/µL com água livre de RNases. As amostras foram aliquotadas e armazenadas a -20°C até o momento de sua utilização. O cDNA resultante foi utilizado na reação de qPCR com 250nM dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada um dos genes-alvo (Quadro 3.11) e *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante. Nesse protocolo foram utilizadas as seguintes condições de temperatura: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg. e 60°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 1 min., em um *ABI PRISM 7500 Detection System* (Applied Biosystem). Curvas de dissociação foram utilizadas para verificar a especificidade do produto.

O gene GAPDH foi utilizado para normalizar os resultados de cada um dos genes testados. A normalização foi realizada dividindo o valor obtido por qPCR para o gene em uma amostra, pelo valor do gene GAPDH da mesma amostra. A modulação da expressão dos genes nos animais infectados foi definida como: a razão entre o valor do gene normalizado de uma amostra, dividido pelo valor de pBACDV1 para o mesmo gene. Desta forma, se obtém o valor da modulação na expressão de um dado gene por qPCR, para cada mutação em estudo.

GENE	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	TAMANHO AMPLICON
GAPDH	5' CGACTTCAACAGCAACTCCCACTC 3'	positiva	278pb
	5' CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC 3'	negativa	
Irf1	5' TGTGTCGTCAGCAGCAGTCTCT 3'	positiva	153pb
	5' GTCTTCGGCTATCTTCCCTTCCT 3'	negativa	
Psm8	5' TGATGCTGCAGTACCGGGGATGG 3'	positiva	222pb
	5' TAGCTCTGCGGCCAAGGTCGTAGG 3'	negativa	
Usp18	5' CTGCCAACCGAGGAAGAC 3'	positiva	73pb
	5' CAATCACGGCAAAGAGTTCATAGT 3'	negativa	
C1r	5' TGGGGACTTCCGCTACATCAC 3'	positiva	191pb
	5' GACACCGGGGCATTTTCTCT 3'	negativa	
IFN α	5' GACTCATCTGCTGCTTGAATGCAACCCTCC 3'	positiva	294pb
	5' GACTCACTCCTTCTCCTCACTCAGTCTTGCC 3'	negativa	
IFN β	5' CGCTGCGTTCCTGCTGTG 3'	positiva	154pb
	5' GATCTTGAAGTCCGCCCTGTAG 3'	negativa	
Ccl5	5' GTGCCCACGTCAAGGAGTATTCT 3'	positiva	82pb
	5' TGGCGGTTCTTCGAGTGACAA 3'	negativa	

Quadro 3.11 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação por qPCR para o estudo do perfil da expressão gênica no tecido cerebral de camundongos infectados com os vírus recombinantes e controles. Fonte: BORDIGNON, 2008.

3.4.6 Análise histopatológica dos vírus recombinantes e controles

Para avaliar o comprometimento do sistema nervoso central (SNC) durante a infecção pelos vírus recombinantes, foram analisados cérebros de animais infectados, pela técnica de histopatologia. Os cérebros dos animais infectados foram coletados com 10 dpi, quando os animais começaram a apresentar sinais de doença e envolvimento do SNC, e foram imediatamente fixados por imersão em solução de 10% formalina. O processamento dos materiais e a análise das lâminas foram feitos em colaboração com a Profa. Dra. Lucia Noronha, do Laboratório de Patologia Experimental da PUC/PR.

Os tecidos cerebrais foram fixados por um período de aproximadamente 48 horas e, em seguida, foram desidratados em banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90% e dois banhos em álcool 100%, diafanizados em três banhos de xilol e impregnados por três banhos em parafina líquida a 65°C, todos por 1 hora, utilizando-se o equipamento histotécnico marca Leica, modelo TP1020. As amostras foram então incluídas em parafina utilizando-se o inclusor marca Leica, modelo EG1160. Os cortes histológicos com cerca de 5 micrômetros foram obtidos utilizando-se micrótomo marca Leica, modelo RM2145.

Para observação dos danos no tecido cerebral, os cortes histológicos em parafina foram cuidadosamente estirados em banho-maria a 60°C, colocados em lâmina de vidro com albumina, para aderência do corte histológico à lâmina, e secados em estufa a 60°C por aproximadamente 1 hora. Posteriormente, as lâminas contendo os cortes histológicos foram submetidas aos processos de desparafinização, desidratação e re-hidratação. A desparafinização consistiu de três banhos sucessivos de 5 min. com xilol aquecido, enquanto a desidratação consistiu de três banhos sucessivos de 2 min. com álcool etílico absoluto, sendo então os cortes re-hidratados com água por 10 min. Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (coloração básica para núcleo e citoplasma das células), analisados em microscópio de luz Nikon Eclipse E600 e fotografados utilizando-se o programa *Image-Pro Plus* versão 4.5 (MediaCybernetics, Bethesda MD).

Para as análises de imunohistoquímica, as amostras de tecido fixadas foram incubadas com anticorpo monoclonal, específico para flavivirus (4G2) diluído (1:100 em 1xPBS), incubadas por 30 min. a 37°C e lavadas 3 vezes por 5 min. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase em polímero de dextran (Envision/Peroxidase, DakoCytomation) também por 30 min., a 37°C. A reação foi revelada utilizando-se o Liquid DAB (DaKoCytomation), e a recuperação do antígeno com o ImmunoRetriever Bio SB Kit.

3.5. Novas mutações NS3-480

Para tentar definir a importância da característica do aminoácido no processo de neurovirulência, foram gerados 10 novos clones substituindo a mutação NS3-480 por novos aminoácidos com diferentes características de carga e índices de hidrofobicidade (Quadro 3.12).

AMINOÁCIDO	CÓDIGO	NOMENCLATURA	CLASSIFICAÇÃO	PROPRIEDADE DO GRUPO RADICAL	ÍNDICE DE HIDROFOBICIDADE
Leucina	L	parental	apolar	hidrofóbica	3.8
Serina	S	480mut	polar	nucleofílica	-0.8
Treonina	T	480THR	polar	nucleofílica	-0.7
Glutamina	Q	480GLN	polar	neutro	-3.5
Glicina	G	480GLY	apolar	alifático simples	-0.4
Prolina	P	480PRO	apolar	hidrofóbica	1.6
Valina	V	480VAL	apolar	hidrofóbica	4.2
Fenilalanina	F	480PHE	aromático	aromático	2.8
Tirosina	Y	480TYR	aromático	aromático	-1.3
Glutamato	E	480GLU	carregado negativ.	ácido	-3.5
Arginina	R	480ARG	carregado positiv.	básico	-4.5
Histidina	H	480HIS	carregado positiv.	básico	-3.2

Quadro 3.12 – Novos aminoácidos selecionados para clonagem na posição NS3-480, para avaliação da importância da característica do aminoácido no processo de neurovirulência. Identificado na primeira linha, o aminoácido do vírus parental não virulento FGA/89, e na segunda, o aminoácido na cepa neurovirulenta FGA/NA-P6. FONTE: *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª edição.

A amplificação das mutações (Quadro 3.12) e a inserção de uma mutação silenciosa que modifica a sequência de um sítio da enzima de restrição BsaBI foi realizada por PCR de fusão conforme descrito no item 3.1.1 (Quadro 3.13), utilizando como molde o genoma viral do clone infeccioso pBACDV1. Todos os fragmentos foram clonados e amplificados em células de inseto, seguindo a mesma metodologia empregada para gerar os demais clones descritos neste trabalho.

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA *	ORIENTAÇÃO (POLARIDADE)	REGIÃO GENÔMICA **
D23 +	5' GAA GGC GAA GTT GGA GCC 3'	positiva	4877 - 4894
480THR-F	5' G GGA CAG CCT ac AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480THR-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT Tgt AGG CTG TCC C 5'	negativa	5947 - 5975
480GLN-F	5' G GGA CAG CCT ca AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480GLN-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT Ttg AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
480GLY-F	5' G GGA CAG CCT gg AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480GLY-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT Tcc AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
480PRO-F	5' G GGA CAG CCT cc AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480PRO-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT Tgg AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
480VAL-F	5' G GGA CAG CCT g TA AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480VAL-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT TAc AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
480PHE-F	5' G GGA CAG CCT TTc AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480PHE-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT gAA AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
480TYR-F	5' G GGA CAG CCT Tac AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480TYR-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT gtA AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
480GLU-F	5' G GGA CAG CCT ga AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480GLU-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT Ttc AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
480ARG-F	5' G GGA CAG CCT cg AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480ARG-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT Tcg AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
480HIS-F	5' G GGA CAG CCT cac AAT AAT <u>GAc GAG GAT C</u> 3'	positiva	5947 - 5975
480HIS-R	5' <u>G ATC CTC gTC</u> ATT ATT gtg AGG CTG TCC C 3'	negativa	5947 - 5975
CN39 -	5' CAT CAA CAC CGC CGC TGT CAG TGT C 3'	negativa	7144 - 7168

* Sequências sublinhadas referentes ao sítio de restrição BsaBI mutado silenciosamente para seleção de clones positivos.

** Contando a partir do primeiro nucleotídeo do clone pBACDV1, cepa BR/90 (*GenBank* AF226685), sendo 1 o primeiro nucleotídeo do genoma viral.

Quadro 3.13 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos NS3-480.

4. RESULTADOS

4.1 Localização das mutações no genoma viral

A primeira etapa do trabalho foi a identificação e o mapeamento das mutações no genoma viral potencialmente responsáveis pelo fenótipo de neurovirulência observado nos animais. As mutações na proteína de Envelope (E402 e E405) estão localizadas na estrutura predita da haste, na região α -hélice putativa denominada elemento $H1^{pred}$ (item 1.4.2) (ALLISON *et al.*, 1999) (Figura 4.1).

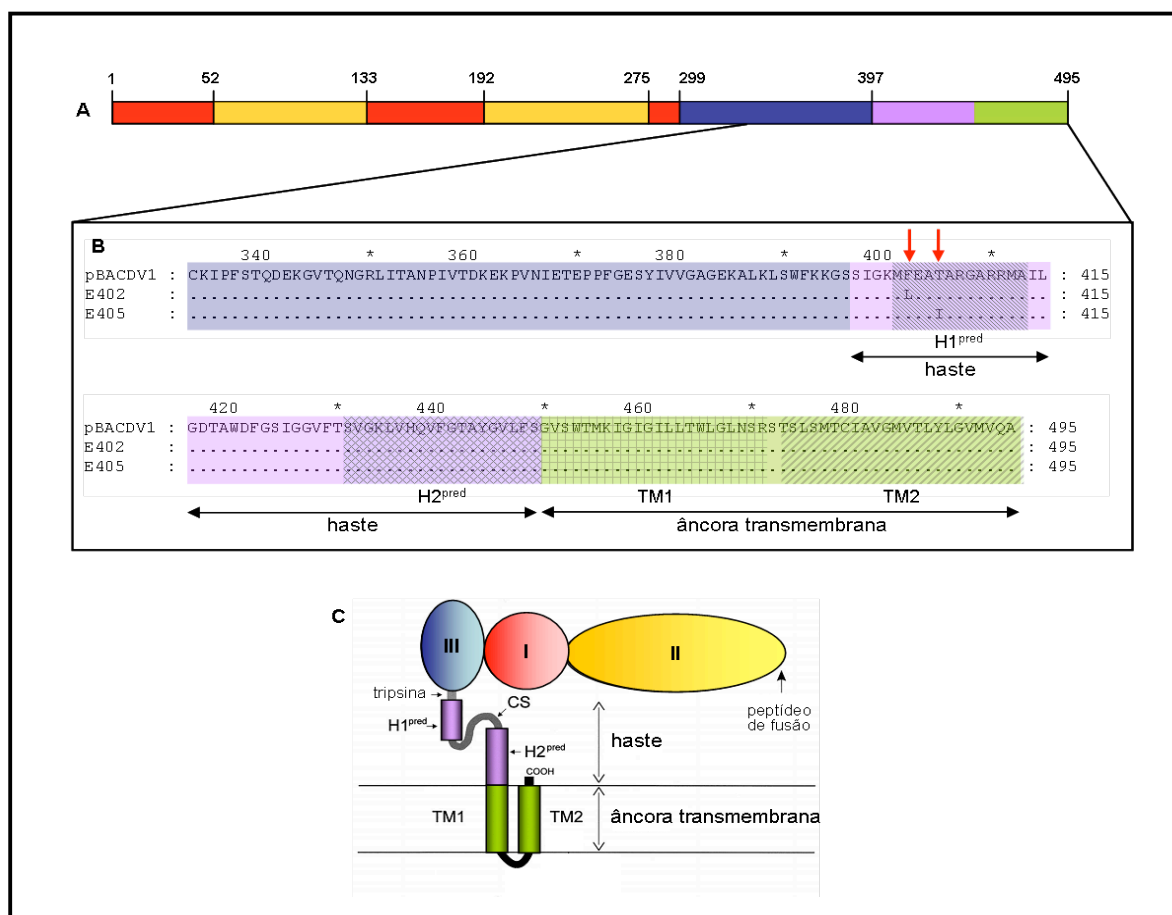


Figura 4.1 – Localização das mutações da proteína de Envelope. **A.** Representação esquemática da proteína E inteira, onde o domínio I está indicado em vermelho, o domínio II em amarelo e domínio III em azul. A região da haste está representada em lilás e a âncora transmembrana em verde. **B.** Vista detalhada da sequência de aminoácidos 333 a 495, mostrando as regiões preditas $H1^{pred}$ e $H2^{pred}$ da haste, e domínios TM1 e TM2 da âncora transmembrana. As setas vermelhas indicam a posição das mutações. **C.** Representação esquemática do monômero da proteína de Envelope do vírus TBE (*Tick-Borne Encephalitis*), seguindo o mesmo esquema de cores da figura (A), adaptado de Allison *et al.* (1999), não escalonado. Além dos domínios da proteína, haste e âncora transmembrana, estão também representados, o local de clivagem da tripsina e a posição do peptídeo de fusão.

As mutações na proteína NS3 estão localizadas no domínio helicase, o qual compreende os aminoácidos 180 a 619 (Item 1.4.3). A mutação NS3-209 está localizada no domínio I da helicase, logo após o motivo I, também chamado de *Walker A*. Já as mutações NS3-435 e NS3-480 estão localizadas no domínio II, logo após os motivos V e VI, respectivamente (XU *et al.*, 2005) (Figura 4.2).

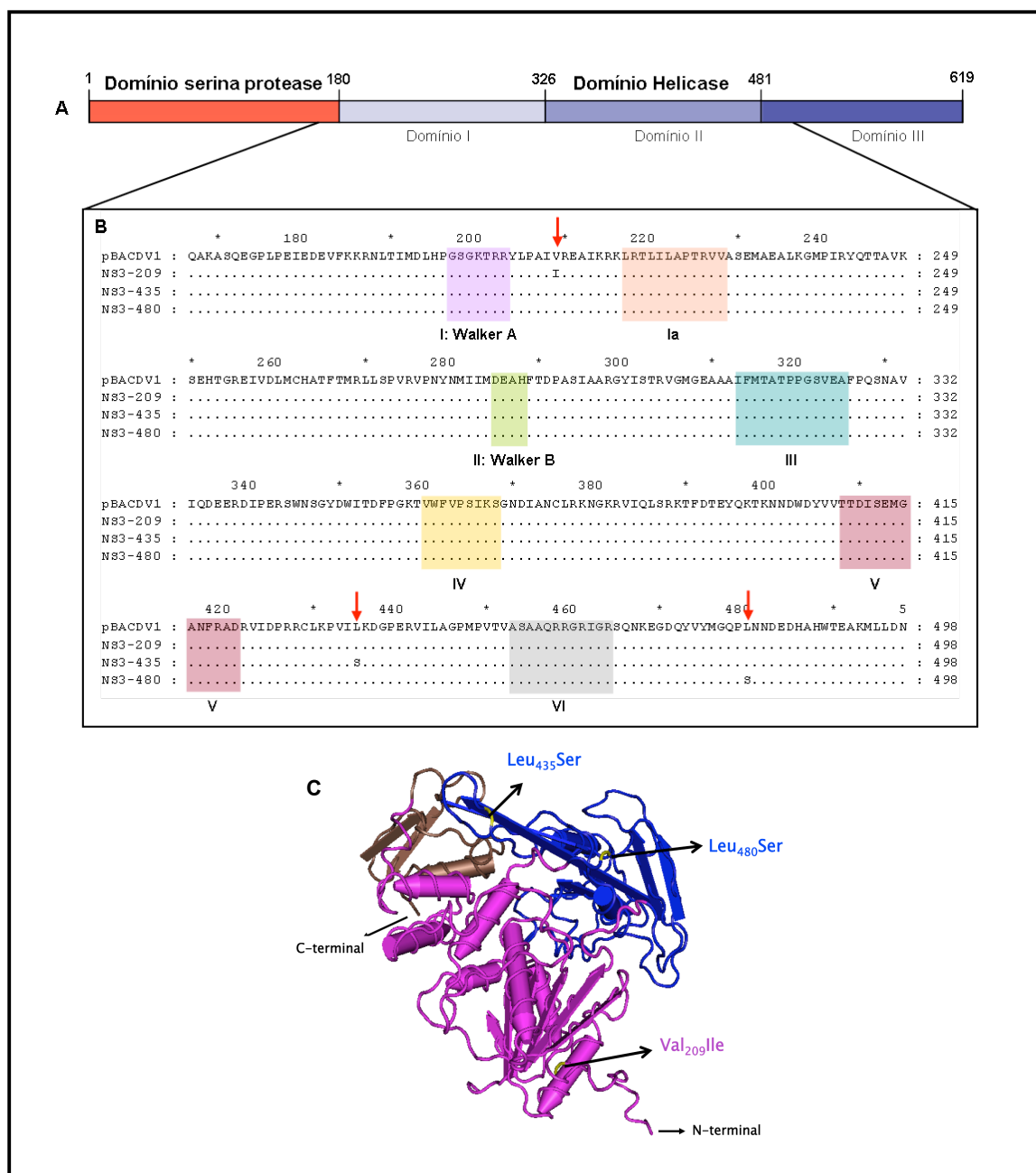


Figura 4.2 – Localização das mutações na proteína NS3. **A.** Representação da proteína NS3 inteira, onde domínio serina protease está indicado em vermelho e o domínio helicase está em diferentes tons de azul. **B.** Vista detalhada da sequência dos aminoácidos 167 a 498, mostrando os domínios conservados na superfamília 2 das helicases, indicados pelas cores lilás (motivo I ou *Walker A*), salmão (motivo Ia), verde (motivo II ou *Walker B*), azul (motivo III), amarelo (motivo IV), bordô (motivo V) e cinza (motivo VI). As setas vermelhas indicam a posição das mutações. **C.** Representação diagramática do domínio helicase da proteína NS3 e localização das mutações, sendo os subdomínios I, II e III representados em rosa, azul e marrom, respectivamente. As setas pretas indicam a posição das mutações (modificado de BORDIGNON, J. (2008) e STROTTMANN, D.M. (2008)).

4.2 Construção de clones recombinantes

Uma vez mapeadas as mutações a etapa seguinte foi a construção dos clones recombinantes. O DNA do clone infeccioso pBACDV1 serviu como molde para a síntese dos fragmentos contendo as mutações em estudo, pela amplificação dos genes correspondentes às proteínas de E e NS3. Para tanto, foi realizada uma PCR de fusão, que consistiu em duas etapas: na primeira reação eram amplificados dois fragmentos (fragm A e fragm B) para cada mutação, e na segunda etapa era feita a fusão destes fragmentos (fragm fusão – F) através da complementaridade das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores de polaridade negativa do fragm A e polaridade positiva do fragm B. A estratégia utilizada para a inserção da mutação NS3-435 foi a amplificação por PCR de um fragmento único (Tabela 3.1 – item 3.1.1).

A Figura 4.3 mostra o perfil eletroforético dos fragmentos de DNA amplificados e purificados em kit comercial, referentes a cada estratégia, sendo o tamanho de cada fragmento correspondente ao esperado (Tabela 3.1 – item 3.1.1).

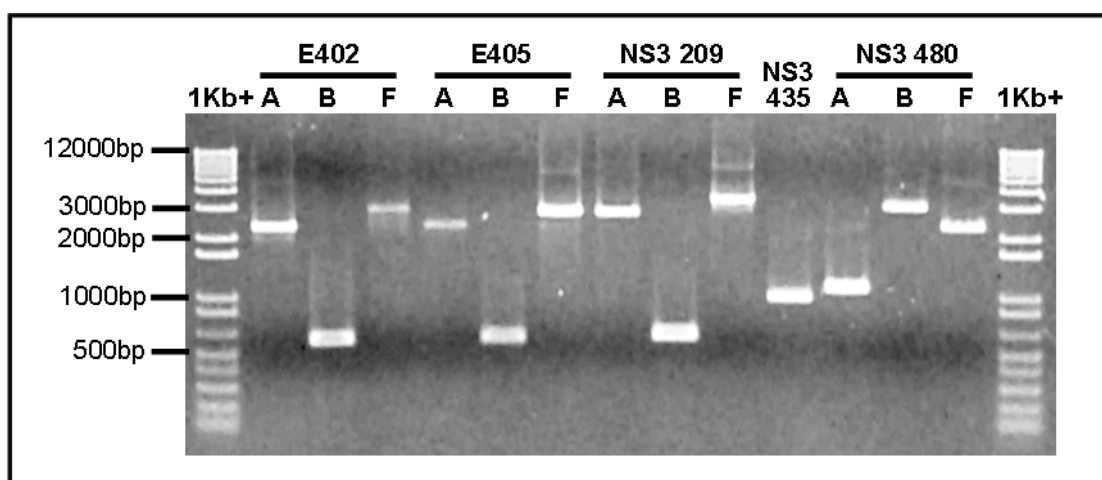


Figura 4.3 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amplificações dos fragmentos mutados. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen), **A** – fragm A, **B** – fragm B, e **F** – fragm de fusão, para cada estratégia de mutação.

Os fragmentos de fusão purificados das mutações E402, E405 e NS3-435, que apresentaram dificuldades na clonagem clássica em pBACDV1, foram primeiramente clonados diretamente em sistema *pGEM-T Easy* para posterior transferência do fragmento para pBACDV1. A clonagem foi realizada seguindo

protocolo do fabricante, com uma proporção de 1:3 (vetor:inserto) e as reações foram incubadas a 16°C ou 4°C por um período de 16 horas.

As ligações foram utilizadas para transformar bactérias TOP10F' cálcio-competentes. As colônias brancas resultantes foram transferidas para uma nova placa numerada para identificação dos possíveis clones. Algumas colônias (entre 4 e 6) de cada clone foram inoculadas em 3mL de meio LB líquido. As culturas foram então sedimentadas por uma breve centrifugação e foram utilizadas para extração do DNA plasmidial com o kit *Wizard Plus SV Miniprep kit*, seguindo protocolo do fabricante. Estes DNAs foram submetidos a sequenciamento nucleotídico para confirmação de sua sequência, sendo imprescindível a ausência de mutações aleatórias. A Figura 4.4 mostra o perfil eletroforético das minipreps dos clones confirmados por sequenciamento, E402pGEM_cl.12, E405pGEM_cl.9 e NS3-435pGEM_cl.11.

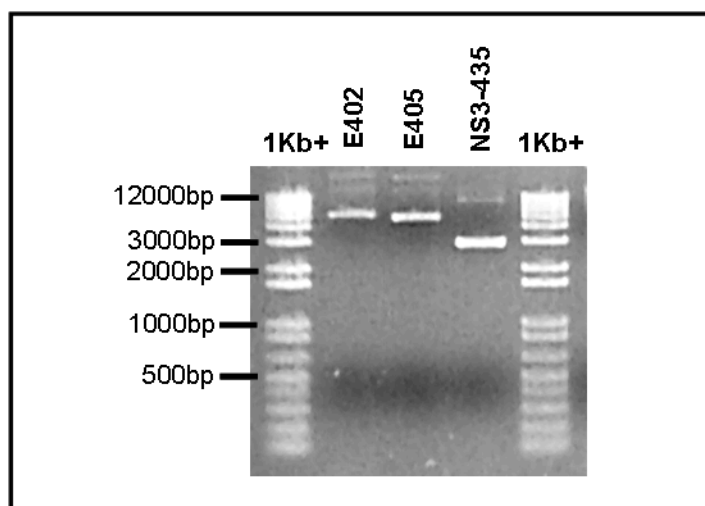


Figura 4.4 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreparações em *pGEM-T Easy* dos clones confirmados por sequenciamento. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen), **E402** – miniprep do clone 12, **E405** – miniprep do clone 9, e **NS3-435** – miniprep do clone 11.

As minipreps dos clones confirmados por sequenciamento E402pGEM_cl12, E405pGEM_cl.9 e NS3-435pGEM_cl.11 (Figura 4.4), e os fragmentos de PCR purificados NS3-209 e NS3-480 (Figura 4.3) foram digeridos com as endonucleases de restrição de acordo com a respectiva estratégia de clonagem, seguindo protocolo do fabricante.

Os clones E402pGEM_cl12. e E405pGEM_cl.9 foram digeridos com as endonucleases de restrição NotI e MluI, gerando cinco fragmentos de diferentes

tamanhos devido à presença de outros sítios NotI e MluI na sequência do plasmídeo *pGEM-T Easy*. O fragmento de interesse de 2.625 pares de base (pb) (Figura 3.4 – item 3.1.7) foi purificado pela excisão de gel de agarose (Figura 4.5). O clone pBACDV1 foi digerido com as mesmas enzimas, e o fragmento de 15.245pb foi igualmente purificado (Figura 4.5).

O fragmento de DNA purificado NS3-209 foi digerido com as endonucleases de restrição MluI e BsiWI, gerando três fragmentos. O fragmento de interesse de 2.571pb (Figura 3.5 – item 3.1.7) foi purificado pela sua excisão do gel de agarose (Figura 4.5). O clone pBACDV1 foi digerido com as mesmas enzimas, e o fragmento de 15.299pb foi igualmente purificado (Figura 4.5).

O clone NS3-435pGEM_cl.11 foi digerido com as endonucleases de restrição BsiWI e RsrII, gerando dois fragmentos, sendo que o de 683pb (Figura 3.6 – item 3.1.7) foi purificado por excisão de gel de agarose (Figura 4.5). O clone pBACDV1 foi digerido com as mesmas enzimas, e o fragmento de 17.187pb foi igualmente purificado (Figura 4.5).

O fragmento de DNA purificado NS3-480 foi digerido com as endonucleases de restrição BsiWI e NheI, gerando três fragmentos. O fragmento de interesse de 1.604pb (Figura 3.7 – item 3.1.7) foi purificado por excisão de gel de agarose (Figura 4.5). O clone pBACDV1 foi digerido com as mesmas enzimas, e o fragmento de 16.266pb foi igualmente purificado (Figura 4.5).

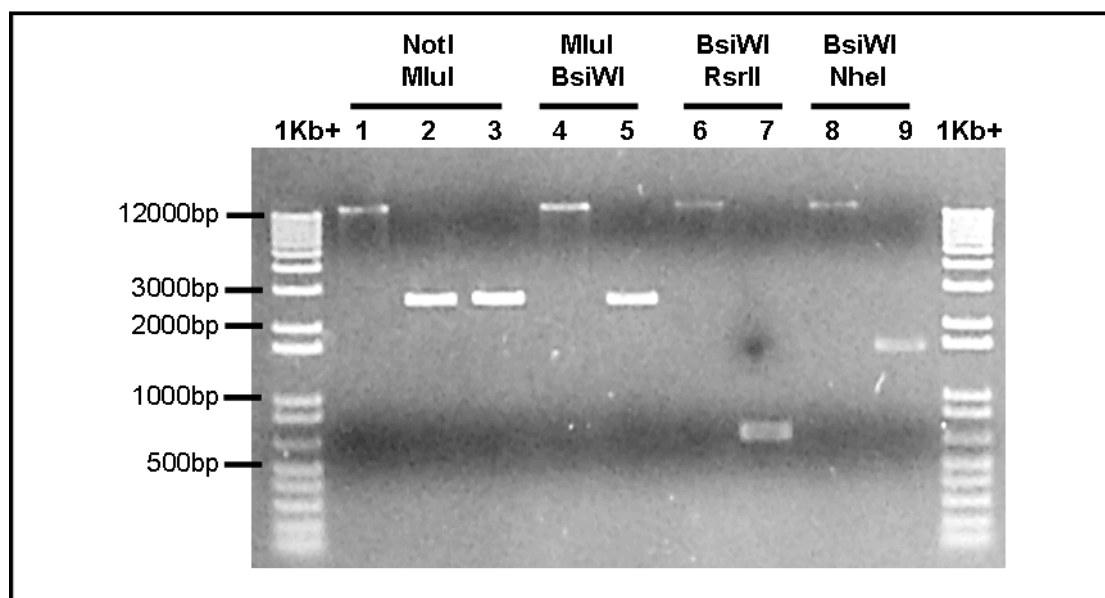


Figura 4.5 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das digestões dos fragmentos contendo as mutações para cada estratégia. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **1** – pBACDV1 NotI/MluI, **2** – E402pGEM_cl.12 NotI/MluI, **3** – E405pGEM_cl.9 NotI/MluI, **4** – pBACDV1 MluI/BsiWI, **5** – NS3-209 MluI/BsiWI, **6** – pBACDV1 BsiWI/RsrII, **7** – NS3-435pGEM_cl.11 BsiWI/RsrII, **8** – pBACDV1 BsiWI/NheI e **9** – NS3-480 BsiWI/NheI.

Cada amostra de DNA gerada foi utilizada para clonagem no clone pBACDV1 pela substituição da região correspondente, seguindo protocolo da enzima T4 DNA ligase. As ligações foram utilizadas para transformar bactérias TOP10 cálcio-competentes. As colônias resultantes foram transferidas para uma nova placa numerada para identificação dos possíveis clones. Algumas colônias de cada clone foram submetidas à triagem através da técnica de PCR de colônia e posterior digestão para confirmação de prováveis clones. Os sítios de restrição utilizados para confirmação dos clones eram modificados pela inserção de uma mutação silenciosa no oligonucleotídeo iniciador do PCR de fusão de acordo com cada estratégia (Tabela 3.3 – item 3.1.9).

A transformação da reação de ligação E402pBAC resultou em apenas 5 colônias, identificadas como col.12.1, col.12.2, col.12.3, col.12.4 e col.12.5. Por ser um número pequeno, não foi realizada a etapa de PCR de colônia e as colônias foram diretamente inoculadas em 20mL de meio TB líquido e crescidas a 30°C por 16 horas. As culturas foram sedimentadas e utilizadas para extração do DNA plasmidial utilizando kit *Wizard Plus SV Miniprep kit* e eluídas em 50µL de água fornecida no kit. Como o sequenciamento de clones em vetor BAC é dificultado pelo seu baixo rendimento, a região clonada foi amplificada por PCR para posterior sequenciamento. Foram realizadas 3 amplificações por clone (Tabela 3.4 – item 3.1.10), que foram purificadas por excisão de gel de agarose e submetidas a sequenciamento (Tabela 3.5 – item 3.1.10). A Figura 4.6A mostra o perfil eletroforético das minipreparações (*minipreps*) dos clones E402pBAC e a Figura 4.6B, a amplificação por PCR dos fragmentos enviados para sequenciamento.

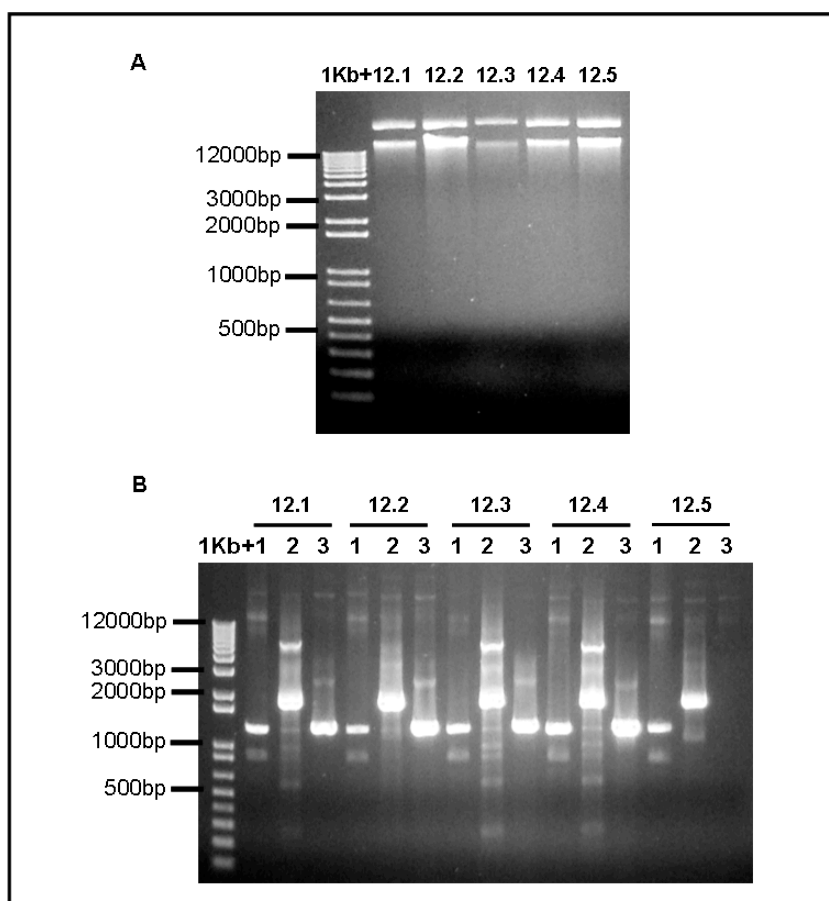


Figura 4.6 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs das minipreps dos clones E402pBAC. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – minipreps, onde 12.1 a 12.5 é a identificação da miniprep de cada colônia testada. **B** – fragmentos amplificados por PCR, não purificados, das minipreps E402pBAC, para sequenciamento.

As colônias bacterianas transformadas com o clone E405pBAC foram triadas por PCR de colônia utilizando os oligonucleotídeos iniciadores D1DomB+ e NarXho-, resultando em fragmentos de 589pb (tabela 3.3 – item 3.1.9). Estes fragmentos foram submetidos à digestão pela endonuclease de restrição BstBI para confirmação. Os clones negativos, que não possuem a mutação de interesse nem a mutação silenciosa no sítio BstBI, apresentam um perfil de digestão com duas bandas, de 307pb e 282pb. Já os clones positivos, que possuem as mutações, não são digeridos, resultando no fragmento de 589pb intacto (Figura 4.7). A Figura 4.8 mostra o perfil eletroforético dos fragmentos de DNA gerados por PCRs de colônia do clone E405pBAC e suas respectivas digestões confirmatórias.

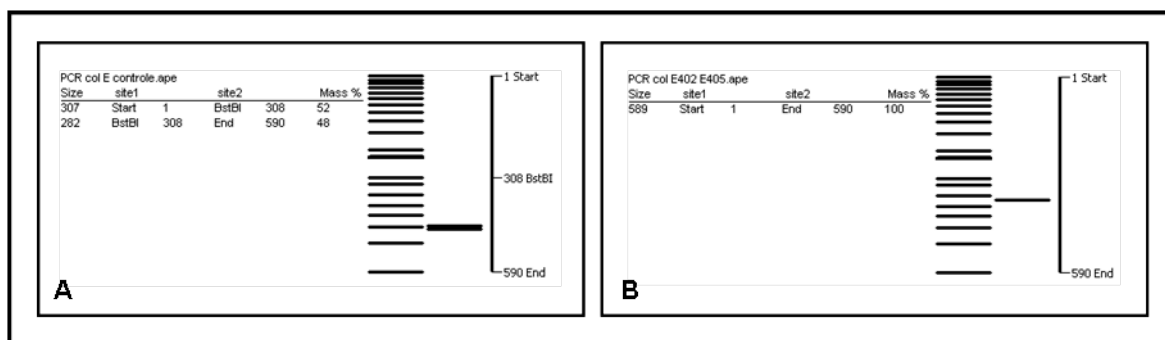


Figura 4.7 – Representação esquemática do perfil da digestão BstBI confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E405pBAC. **A** – representação do clone negativo. **B** – representação do clone positivo.

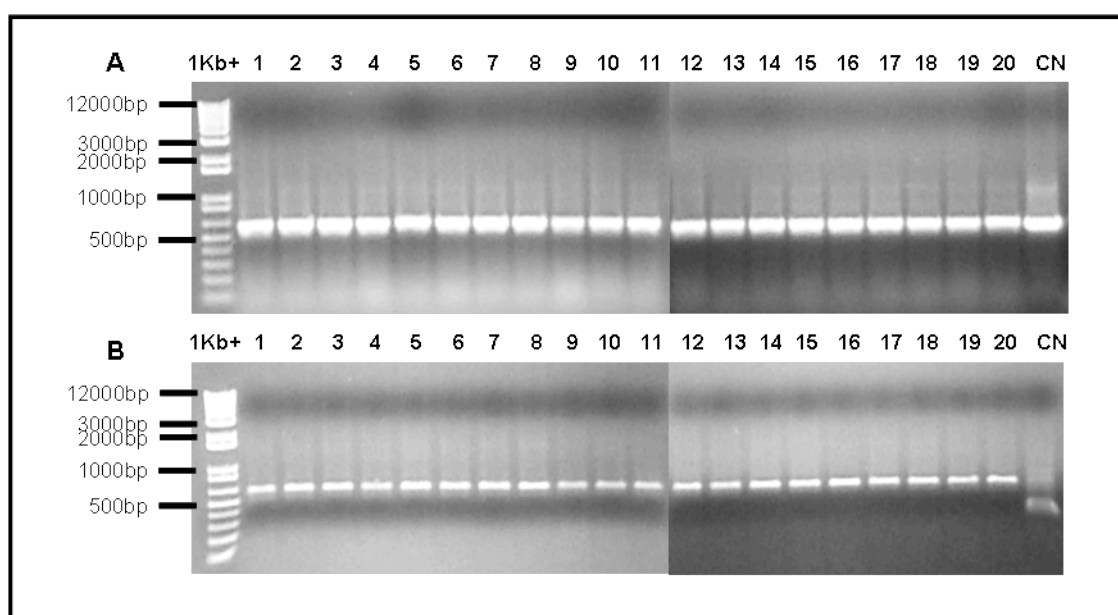


Figura 4.8 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E405pBAC. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – PCRs de colônia, onde 1 a 20 é a identificação de cada colônia testada e CN é o controle negativo (PCR do clone pBACDV1). **B** – digestão dos PCRs de colônia com enzima BstBI, onde 1 a 20 é a identificação de cada colônia testada e CN é o controle negativo.

Todas as colônias bacterianas do clone E405pBAC foram positivas para presença da mutação de interesse E405. Por ser imprescindível a ausência de mutações aleatórias, os clones E405pBAC cl.9.5, cl.9.7, cl.9.13 e cl.9.17 foram escolhidos para confirmação de sua sequência nucleotídica por sequenciamento. Estes clones foram inoculados em meio líquido e a extração do DNA plasmidial foi realizada como descrito anteriormente para os clones E402. O DNA das reações de *minipreps* foram amplificadas por PCR com os oligonucleotídeos D1+ e D18- (Tabela 3.4 – item 3.1.10), resultando em fragmentos de DNA de 2.720pb, que foram purificadas por excisão de gel de agarose e submetidas a sequenciamento (Tabela

3.5 – item 3.1.10). A Figura 4.9A mostra o perfil eletroforético do DNA obtido por *minipreps* dos clones E405pBAC e a Figura 4.9B, a amplificação dos fragmentos de DNA respectivos.

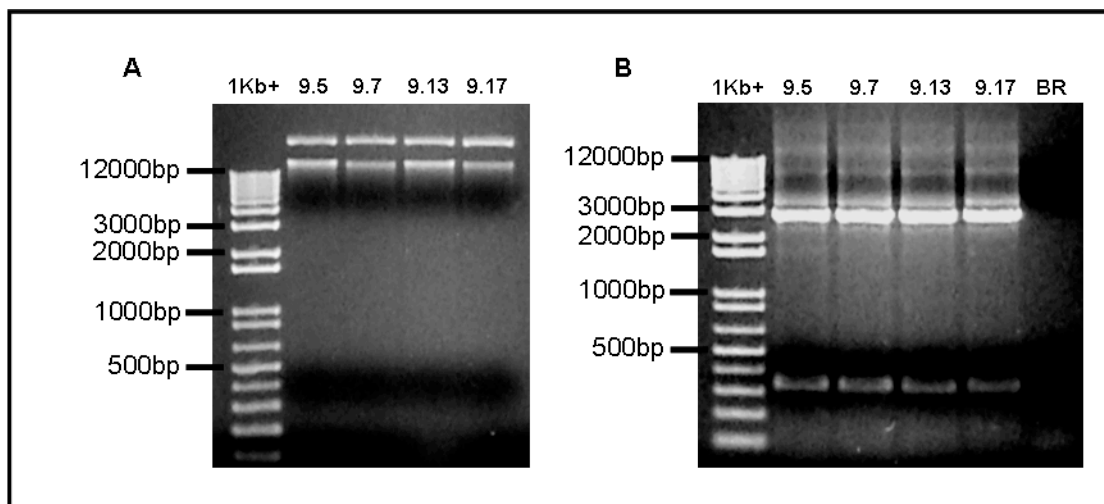


Figura 4.9 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs das minipreps dos clones E405pBAC. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – minipreps, onde 9.5 a 9.17 é a identificação da miniprep de cada colônia testada. **B** – PCRs não purificadas das minipreps E405pBAC, para sequenciamento, onde BR é o controle negativo (água).

Todas as 13 colônias bacterianas obtidas do processo de clonagem da NS3-209pBAC foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores CN10+ e CN20-, resultando em fragmentos de 831pb. Estes fragmentos foram submetidos à digestão pela endonuclease de restrição EcoRV para confirmação. Como o fragmento amplificado possui um sítio EcoRV a mais, fora da região da mutação, os clones negativos apresentam um perfil de digestão com três bandas, com os tamanhos de 499, 215 e 117pb. Já os clones positivos, apresentam um perfil de dois fragmentos, de 499 e 332pb (Figura 4.10). A Figura 4.11 mostra o perfil eletroforético das amostras de DNA obtidas por PCRs de colônia de NS3-209pBAC e suas respectivas digestões confirmatórias.

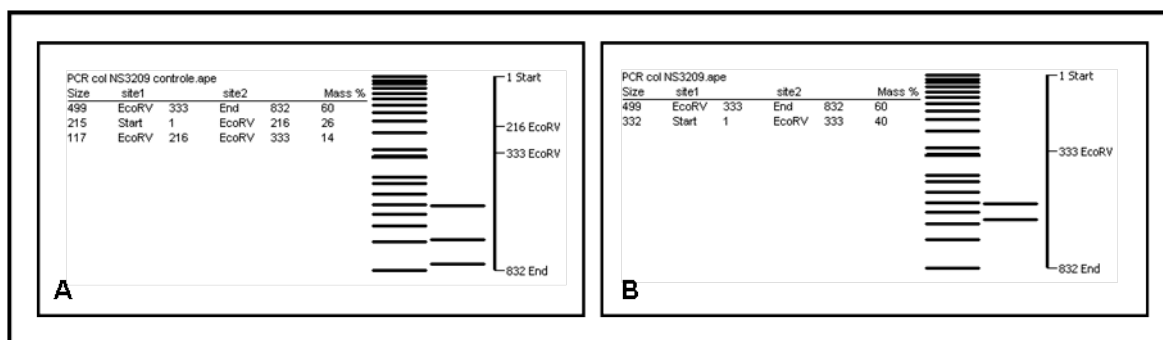


Figura 4.10 – Representação esquemática do perfil da digestão EcoRV confirmatória dos PCRs de colônia dos clones NS3-209pBAC. **A** – representação do clone negativo. **B** – representação do clone positivo.

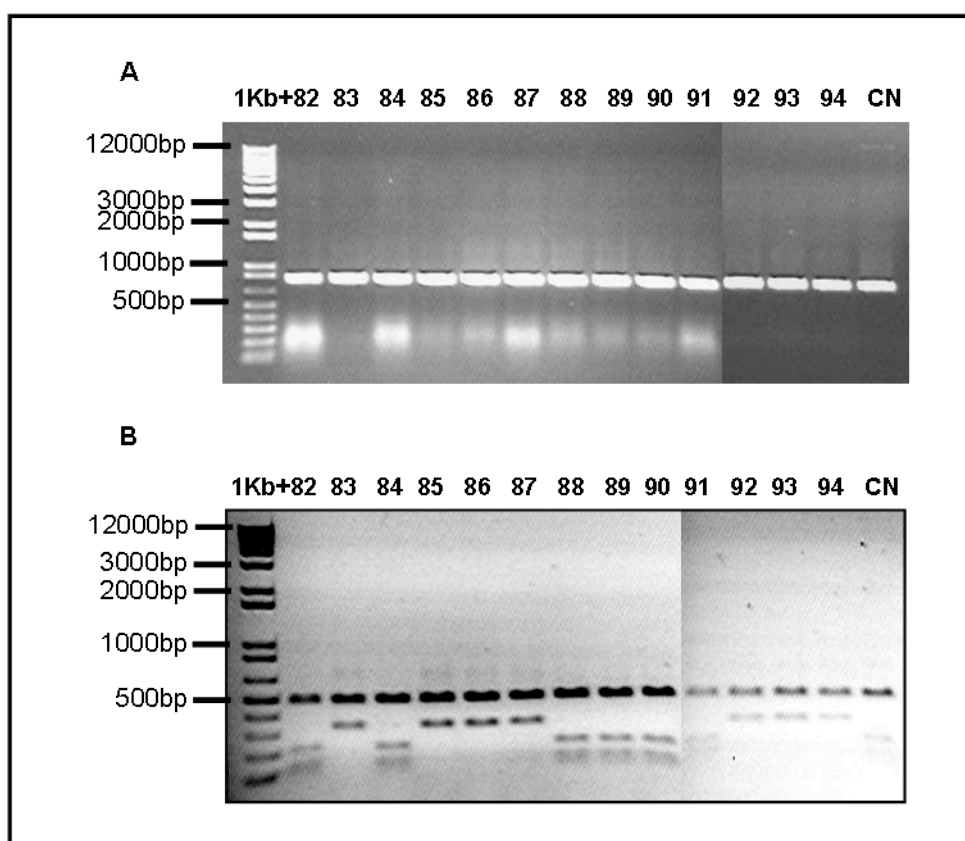


Figura 4.11 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones NS3-209pBAC. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – PCRs de colônia, onde 82 a 94 é a identificação de cada colônia testada e CN é o controle negativo (PCR do clone pBACDV1). **B** – digestão dos PCRs de colônia com enzima EcoRV, onde 82 a 94 é a identificação de cada colônia testada e CN é o controle negativo.

Das 13 colônias geradas no processo de clonagem de NS3-209pBAC testadas pela técnica de PCR colônia e digestão, 7 foram positivas para presença da mutação de interesse NS3-209. Por ser imprescindível a ausência de mutações aleatórias, todos clones NS3-209pBAC positivos, denominados cl.83, cl.85, cl.86, cl.87, cl.92, cl.93 e cl.94, foram escolhidos para confirmação de sua sequência

nucleotídica. Estes clones foram inoculados em meio líquido e a extração do DNA plasmidial foi realizada como descrito anteriormente para os clones E402. O DNA das *minipreps* foram amplificadas com os oligonucleotídeos PhD20+ e CN20- (Tabela 3.4 – item 3.1.10), resultando em fragmentos de peso molecular de 3.550pb, que foram purificadas por excisão de gel de agarose e submetidas ao sequenciamento (Tabela 3.5 – item 3.1.10). A Figura 4.12 mostra o perfil eletroforético do DNA referente aos clones NS3-209pBAC e a amplificação dos mesmos por PCR.

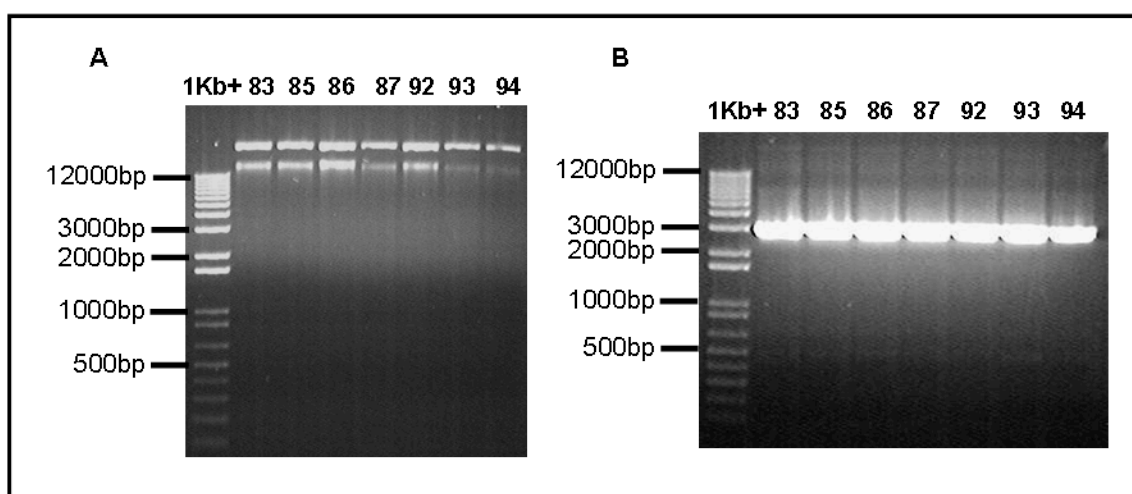


Figura 4.12 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs a partir das *minipreps* dos clones NS3-209pBAC. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – *minipreps*, onde 83 a 94 é a identificação de cada colônia testada. **B** – fragmentos de DNA das amplificações por PCR não purificados das *minipreps* do clone NS3-209pBAC, para sequenciamento.

Quatro colônias bacterianas obtidas após a transformação da ligação NS3-435pBAC foram escolhidas e identificadas como col.11.1, col.11.2, col.11.3 e col.11.4. Para se verificar a inserção desta mutação no clone, as colônias foram diretamente inoculadas em meio líquido para a *miniprep* de DNA do clone (Figura 4.13 A). Após a obtenção do DNA plasmidial, a região clonada foi amplificada por PCR com os oligonucleotídeos D23+ e Hel3' (Quadro 3.4 – item 3.1.10), resultando em fragmentos de 1.500pb, que foram utilizados para o seqüenciamento nucleotídico (Figura 4.13B) (Quadro 3.5 – item 3.1.10).

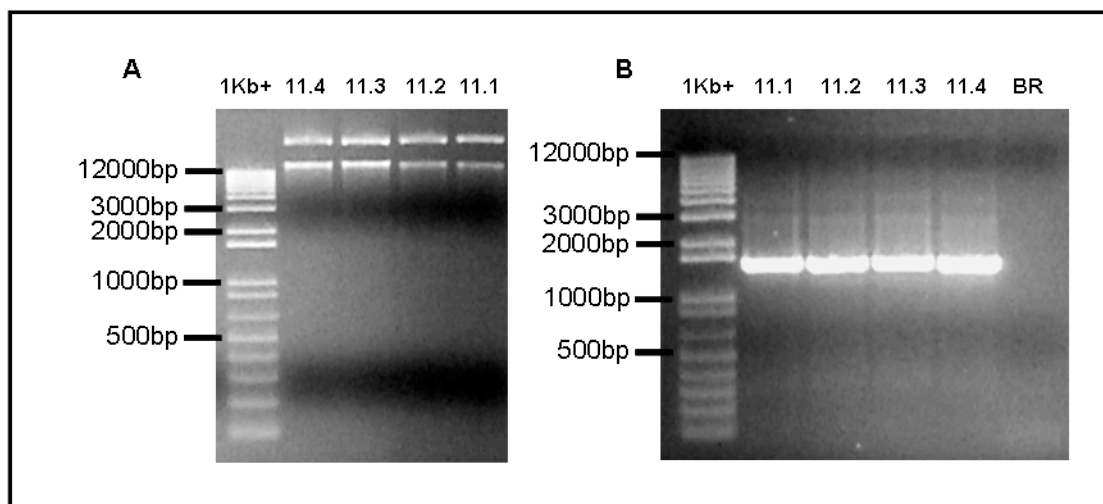


Figura 4.13 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs das minipreps dos clones NS3-435pBAC. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – minipreps, onde 11.1 a 11.4 é a identificação da miniprep de cada colônia testada. **B** – PCRs purificadas das minipreps NS3-435pBAC, para sequenciamento, onde BR é o controle negativo (água).

As colônias bacterianas obtidas no processo de clonagem da amostra NS3-480pBAC foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores CN14+ e Hel3', resultando em fragmentos de 753pb (Quadro 3.3 – item 3.1.9). Estes fragmentos foram submetidos à digestão pela endonuclease de restrição BsaBI para confirmação. Os clones negativos apresentam um perfil de digestão com duas bandas, de 411 e 342pb. Já os clones positivos, não são digeridos, resultando no fragmento de 753pb intacto (Figura 4.14). A Figura 4.15 mostra o perfil eletroforético dos PCRs de colônia NS3-480pBAC e suas respectivas digestões confirmatórias.

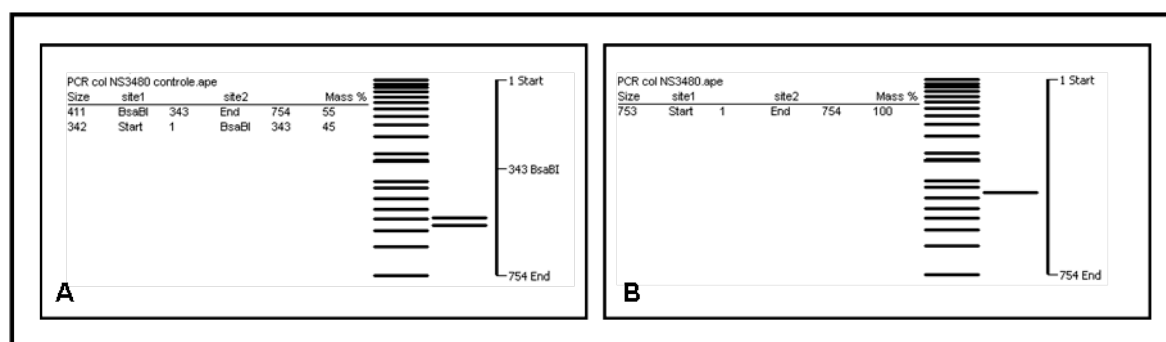


Figura 4.14 – Representação esquemática do perfil da digestão BsaBI confirmatória dos PCRs de colônia dos clones NS3-480pBAC. **A** – representação do clone negativo. **B** – representação do clone positivo.

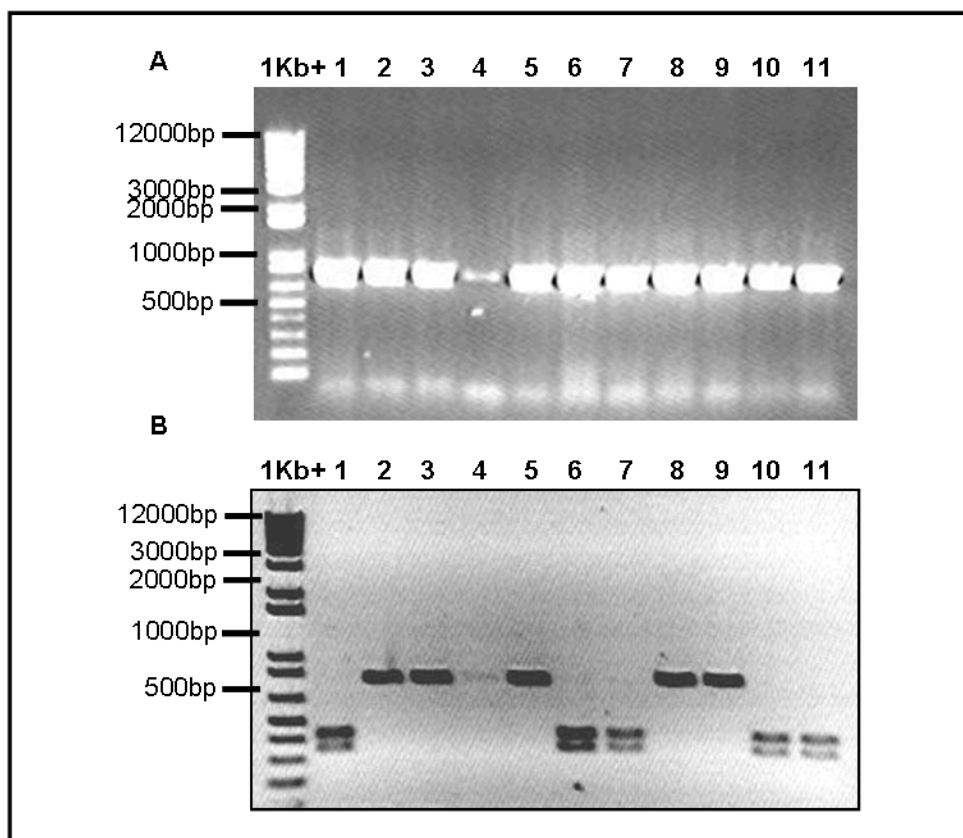


Figura 4.15 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones NS3-480pBAC. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – PCRs de colônia, onde 1 a 11 é a identificação de cada colônia testada. **B** – digestão dos PCRs de colônia com enzima BsaBI, onde 1 a 11 é a identificação de cada colônia testada.

Das 11 colônias bacterianas obtidas da clonagem da amostra NS3-480pBAC que foram testadas pela técnica de PCR colônia e digestão, 6 foram positivas para presença da mutação de interesse NS3-480. Por ser imprescindível a ausência de mutações aleatórias, todos os clones NS3-480pBAC positivos, denominados cl.2, cl.3, cl.4, cl.5, cl.8 e cl.9, foram escolhidos para confirmação de sua sequência nucleotídica. Estes clones foram inoculados em meio líquido e a extração do DNA plasmidial foi realizada como descrito anteriormente para os clones E402. As *minipreps* referentes a esses clones foram amplificadas por PCR com os oligonucleotídeos CN10+ e D6-, resultando em fragmentos de 2.083pb (Quadro 3.4 – item 3.1.10), que foram purificados e seqüenciados (Quadro 3.5 – item 3.1.10). A Figura 4.16 mostra o perfil eletroforético das minipreps dos clones NS3-480pBAC e a amplificação dos respectivos PCRs.

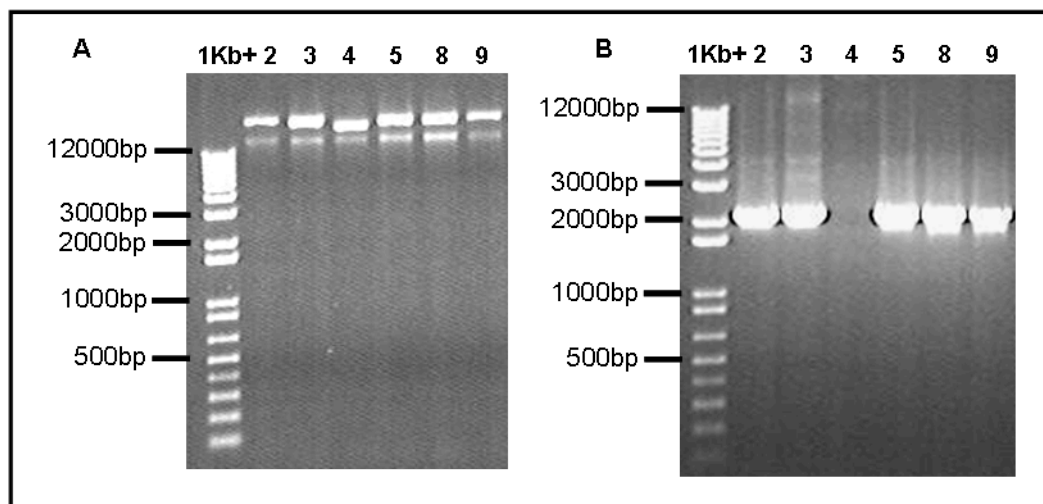


Figura 4.16 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps e PCRs das minipreps dos clones NS3-480pBAC. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – minipreps, onde 2 a 9 é a identificação da miniprep de cada colônia testada. **B** – fragmentos da amplificação dos PCR não purificados das minipreps NS3-480pBAC, para sequenciamento.

Os clones em que cada uma das mutações de interesse foi inserida foram identificados como: E402pBAC_cl.12.2, E405pBAC_cl.9.13, NS3-209pBAC_cl.85, NS3-435pBAC_cl.11.4 e NS3-480pBAC_cl.9 (Quadro 4.1). Estes clones foram utilizados para a inserção de outras mutações para a obtenção dos clones duplos e triplo mutantes (Item 3.1.11), referentes à combinação das mutações localizadas nas proteínas E e NS3, de cada um dos vírus neuroadaptados (FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6 – Quadro 1.1, item 1.5).

O clone duplo mutante E405/NS3-435 foi construído pela inserção da mutação NS3-435, do clone NS3-435pGEM_cl.11, no clone E405pBAC_cl.9.13, através da substituição do fragmento BsiWI/RsrII. Para o clone E402/NS3-209, a construção foi feita pela inserção da mutação NS3-209 do clone NS3-209pBAC_cl.85, na construção E402pBAC_cl.12.2, com a substituição do fragmento MluI/BsiWI. O duplo mutante E402/NS3-480 foi gerado pela inserção da mutação NS3-480 do clone NS3-480pBAC_cl.9, no clone E402pBAC_cl.12.2, pela substituição do fragmento BsiWI/NheI, e o clone triplo mutante E402/NS3-209/NS3-480 foi construído pela inserção da mutação NS3-480 do PCR de fusão purificado, no clone duplo mutante E402/NS3-209_cl.85 pela substituição do fragmento BsiWI/NheI (Figura 4.17).

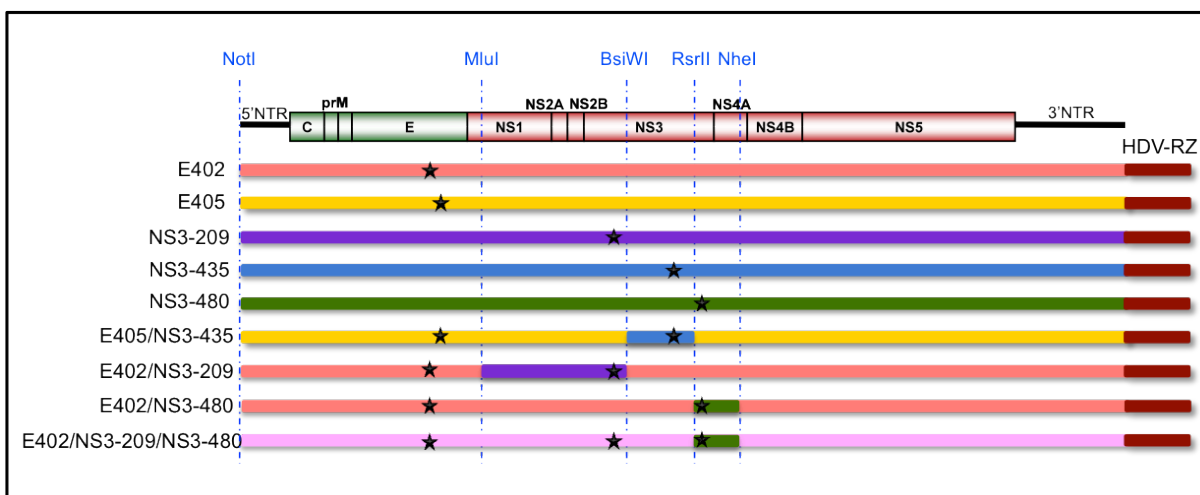


Figura 4.17 – Esquema das estratégias dos clones duplo e triplo mutantes pela substituição de fragmentos. Nos clones E405/NS3-435, E402/NS3-209 e E402/NS480, as cores representam o *backbone* e os fragmentos utilizados para a clonagem da segunda mutação. As estrelas pretas indicam a localização de cada mutação.

A Figura 4.18 mostra o perfil eletroforético das digestões purificadas para construção dos clones duplos e triplo mutantes.

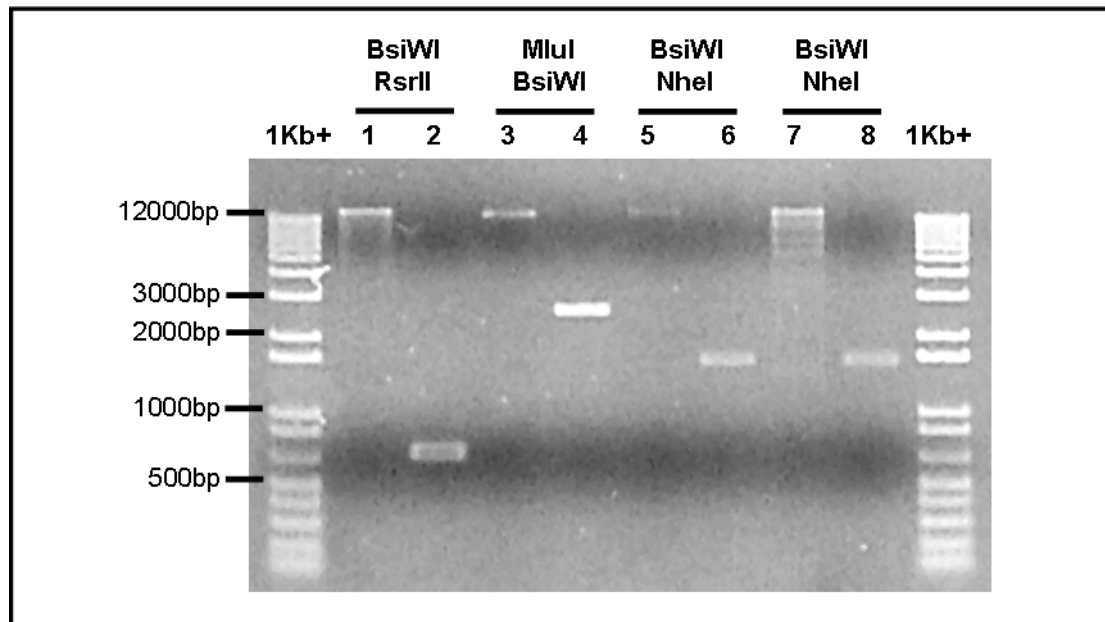


Figura 4.18 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das digestões dos fragmentos contendo as mutações para estratégias dos duplos mutantes. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **1** – E405pBAC_cl.9.13 BsiWI/RsrII, **2** – NS3-435pGEM_cl.11 BsiWI/RsrII, **3** – E402pBAC_cl.12.2 MluI/BsiWI, **4** – NS3-209pBAC_cl.85 MluI/BsiWI, **5** – E402pBAC_cl.12.2 BsiWI/NheI, **6** – NS3-480pBAC_cl.9 BsiWI/NheI, **7** – E402/NS3-209_cl.85 BsiWI/NheI e **8** – NS3-480 BsiWI/NheI.

A Figura 4.19 mostra o perfil eletroforético da triagem das colônias bacterianas obtidas na construção E405/NS3-435, pela técnica de PCR de colônia. Estes fragmentos foram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores D23+ e Hel3' (1.500pb) (Quadro 3.4 – item 3.1.10), com enzima de alta fidelidade, e seqüenciados (Quadro 3.5 – item 3.1.10).

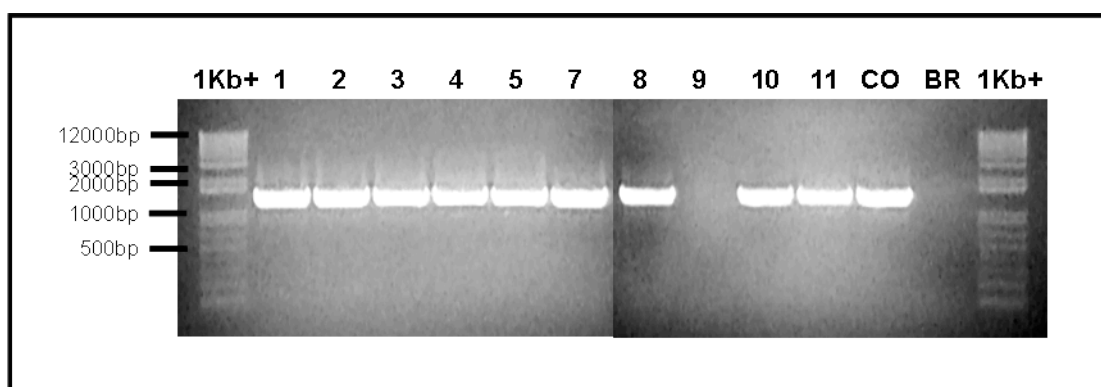


Figura 4.19 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação dos PCRs de colônia dos clones E405/NS3-435, onde **1Kb+** é o marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen) e **1 a 11** é a identificação de cada colônia testada, **CO** é o controle positivo da amplificação (PCR do clone E405pBAC_cl.9.13) e **BR** é o branco (água).

Após a determinação da seqüência nucleotídica o clone 3, identificado como E405/NS3-435_cl.3, foi selecionado para prosseguir com as construções. (Figura 4.21).

Todas as colônias bacterianas crescidas, para a obtenção do clone E402/NS3-209, foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores CN10+ e CN20-, gerando fragmentos de 831pb, que foram submetidos à digestão pela endonuclease de restrição EcoRV para confirmação. A Figura 4.20 mostra o perfil eletroforético da triagem destas colônias, pela técnica de PCR de colônia, e suas respectivas digestões confirmatórias.

A Figura 4.21 mostra o perfil eletroforético da triagem das únicas 6 colônias bacterianas resultantes do processo para obtenção do clone E402/NS3-480. Os oligonucleotídeos iniciadores CN14+ e Hel3', foram usados para amplificar fragmentos de 753pb, que foram submetidos à digestão pela endonuclease de restrição BsaBI para confirmação.

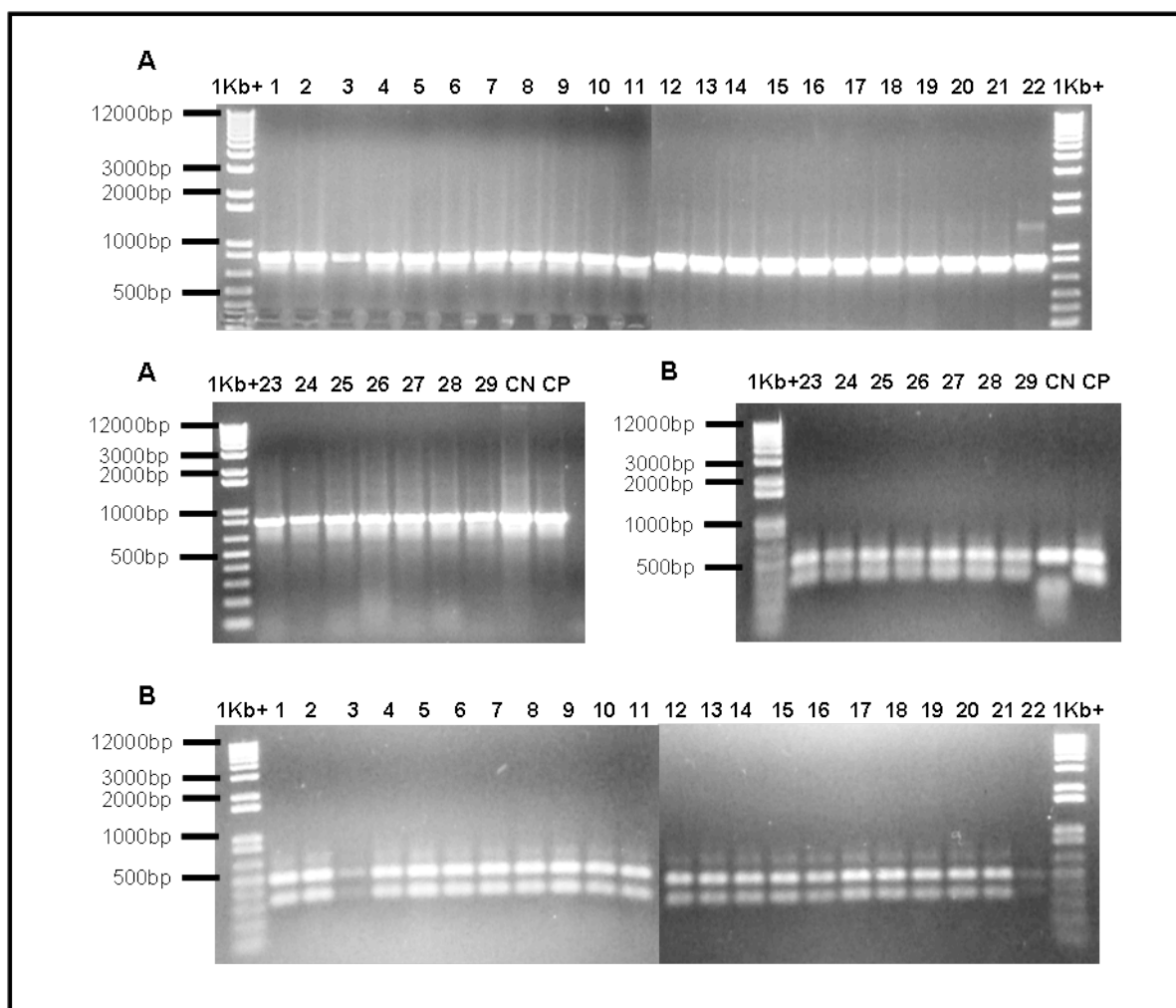


Figura 4.20 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação e digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E402/NS3-209. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – PCRs de colônia, onde 1 a 29 é a identificação de cada colônia testada, CN é o controle negativo (PCR do clone pBACDV1) e CP é o controle positivo (PCR do clone NS3-209pBAC_cl.85). **B** – digestão dos PCRs de colônia com enzima EcoRV, onde 1 a 29 é a identificação de cada colônia testada, CN é o controle negativo (PCR do clone pBACDV1) e CP é o controle positivo (PCR do clone NS3-209pBAC_cl.85).

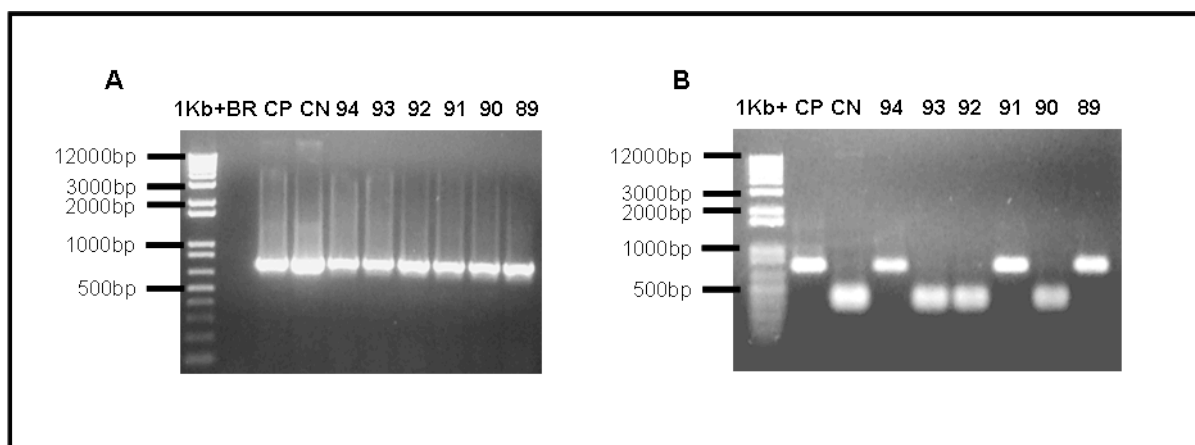


Figura 4.21 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação e digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E402/NS3-480. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – PCRs de colônia, onde 89 a 94 é a identificação de cada colônia testada, CN é o controle negativo (PCR do clone pBACDV1), CP é o controle positivo (PCR do clone NS3-480pBAC_cl.9) e BR é o branco (água). **B** – digestão dos PCRs de colônia com enzima BsaBI, onde 89 a 94 é a identificação de cada colônia testada, CN é o controle negativo (PCR do clone pBACDV1), CP é o controle positivo (PCR do clone NS3-480pBAC_cl.9).

Três colônias bacterianas positivas de cada clonagem, E402/NS3-209 colônias 10, 13 e 17, e E402/NS3-480 colônias 89, 91 e 94 foram selecionadas e o DNA plasmidial purificado e caracterizadas. (Figura 4.22).

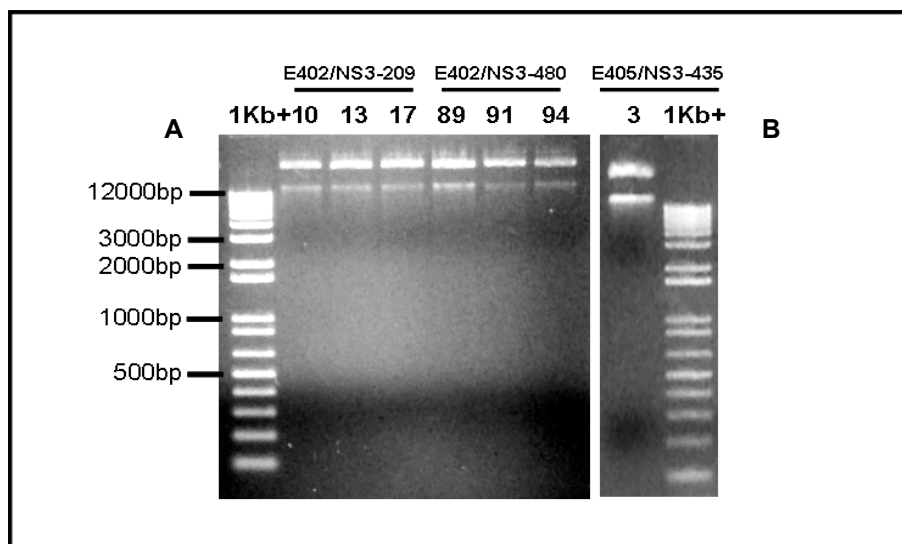


Figura 4.22 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das minipreps dos clones duplo mutantes. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – Minipreps dos clones E402/NS3-209 e E402/NS3-480 enviados para sequenciamento, onde 10, 13, 17, 89, 91 e 94 é a identificação dos possíveis clones. **B** – Miniprep do clone E405/NS3-435 cl.3 confirmado por sequenciamento.

O DNA das *minipreps* correspondente aos clones E402/NS3-209 e E402/NS3-480 foi amplificado com diferentes pares de oligonucleotídeos (Quadro 3.6 – item 3.1.11) e posteriormente purificado (Figura 4.23).

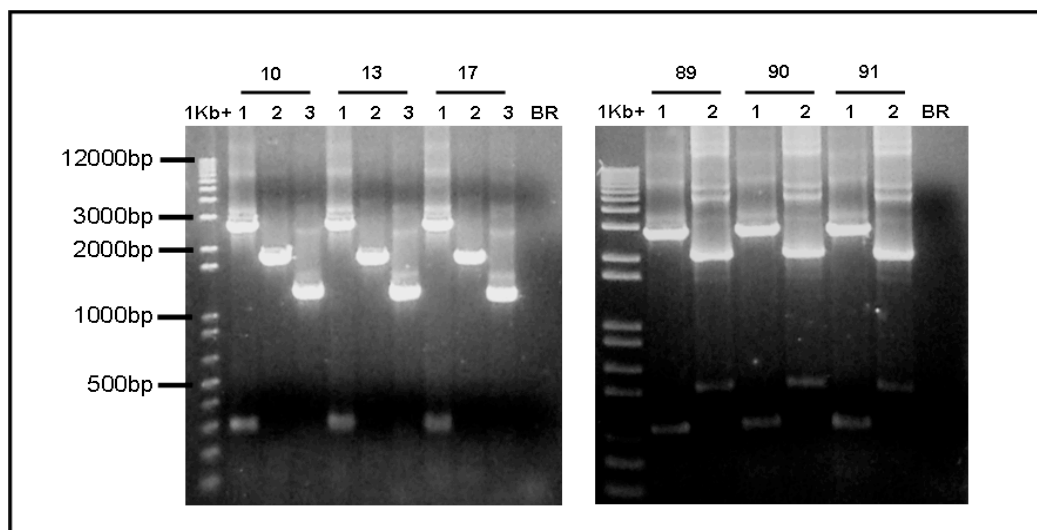


Figura 4.23 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação dos PCRs das minipreps E402/NS3-209 (10, 13 e 17) e E402/NS3-480 (89, 90 e 91), onde **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen), **1 a 3** é a identificação do fragmento amplificado e **BR** é o branco (água).

A Figura 4.24 mostra o perfil eletroforético das amostras de DNA plasmidial provenientes das colônias bacterianas obtidas na construção E402/NS3-209/NS3-480, pela técnica de PCR de colônia. Estes fragmentos foram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores CN14+ e Hel3', gerando fragmentos de 753pb, que foram submetidos à digestão pela endonuclease de restrição BsaBI para confirmação (Quadro 3.3 – item 3.1.9).

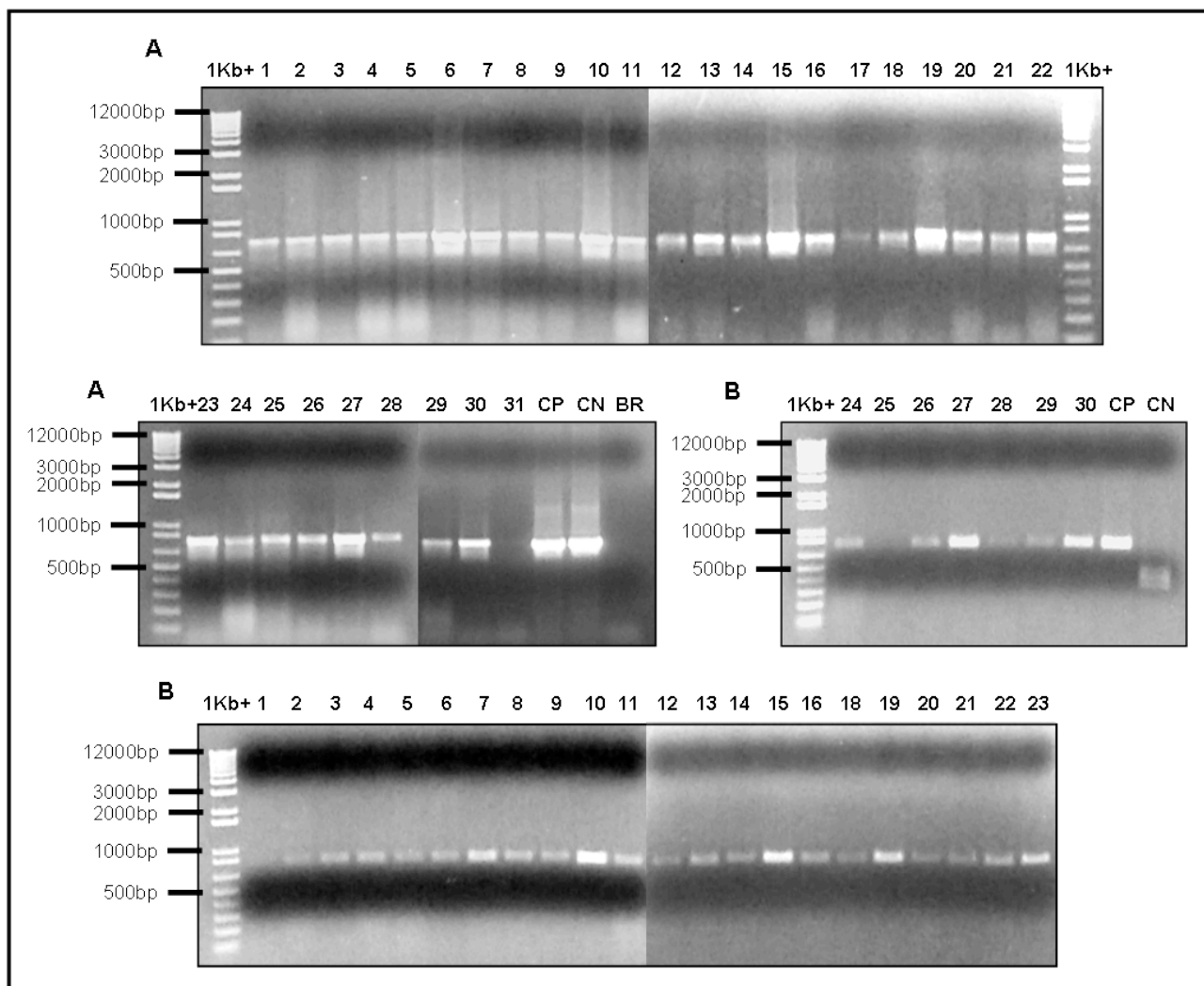


Figura 4.24 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da amplificação e digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos clones E402/NS3-209/NS3-480. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – PCRs de colônia, onde 1 a 31 é a identificação de cada colônia testada, CN é o controle negativo (PCR do clone pBACDV1), CP é o controle positivo (PCR do clone NS3-480pBAC_cl.9 e BR é o branco). **B** – digestão dos PCRs de colônia com enzima BsaBI, onde 1 a 30 é a identificação de cada colônia testada, CN é o controle negativo (PCR do clone pBACDV1) e CP é o controle positivo (PCR do clone NS3-480pBAC_cl.9).

As colônias bacterianas, identificadas como 10, 15, 19, 23, 27 e 30, foram amplificadas pela técnica de PCR de colônia com os oligonucleotídeos D23+ e D6-, gerando fragmentos de 2.118pb que foram seqüenciados (Quadro 3.6 – item 3.1.11) (Figura 4.25A).

Após a caracterização genética, o clone 27 foi selecionado e purificado para prosseguir nas construções, sendo identificado como E402/NS3-209/NS3-480_cl.27. (Figura 4.25B).

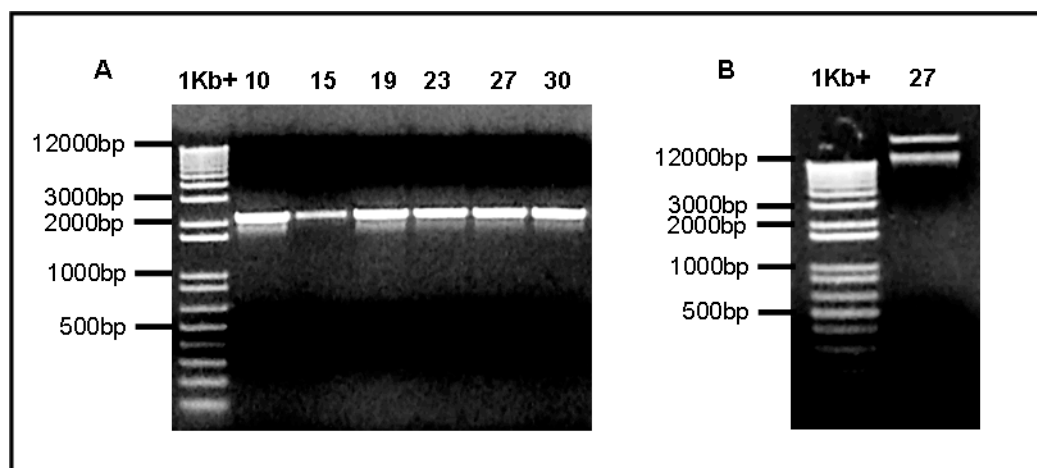


Figura 4.25 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos clones triplo mutantes. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – Amplificações por PCRs dos clones triplo mutante E402/NS3-209/NS3-480 enviados para sequenciamento, onde 10, 15, 19, 23, 27 e 30 é a identificação dos possíveis clones. **B** – Miniprep do clone E402/NS3-209/NS3-480 cl.27 confirmado por sequenciamento.

Os novos clones que continham a sequência correta foram identificados da seguinte maneira: E405/NS3-435_cl.3, E402/NS3-209_cl.17, E402/NS3-480_cl.89 e E402/NS3-209/NS3-480_cl.27 (Quadro 4.1), completando as construções de forma a obter todas as combinações das mutações localizadas nas proteínas E e NS3, referente a cada um dos vírus neuroadaptados (FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6 – Quadro 1.1, item 1.5).

CLONE	INSERTO	VETOR	ENZIMAS	# CLONE
E402	fragmento E402pGEM	pBAC	NotI/MluI	12.2
E405	fragmento E405pGEM	pBAC	NotI/MluI	9.13
NS3-209	PCR NS3-209	pBAC	MluI/BsiWI	85
NS3-435	fragmento NS3-435pGEM	pBAC	BsiWI/RsrII	11.4
NS3-480	PCR NS3-480	pBAC	BsiWI/NheI	9
E405/NS3-435	fragmento NS3-435pGEM	E405pBAC	BsiWI/RsrII	3
E402/NS3-209	fragmento NS3-209pBAC	E402pBAC	MluI/BsiWI	17
E402/NS3-480	fragmento NS3-480pBAC	E402pBAC	BsiWI/NheI	89
E402/NS3-209/NS3-480	PCR NS3-480	E402/NS3-209pBAC	BsiWI/NheI	27

Quadro 4.1 – Resumo da identificação dos clones gerados.

4.3 Geração de vírus recombinantes

4.3.1 Preparação do DNA dos clones e transcrição *in vitro*

A etapa subsequente da geração de todos os clones contendo as mutações de interesse isoladamente ou em conjunto foi a geração dos vírus recombinantes. Para tal, após a construção e confirmação da correta sequência dos fragmentos clonados, as *minipreps* de DNA de cada clone (Figura 4.26) foram linearizadas pela digestão com a enzima de restrição *Swa*I, de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante. Em seguida, as reações eram purificadas pela extração com fenol e precipitação com etanol (Figura 4.27).

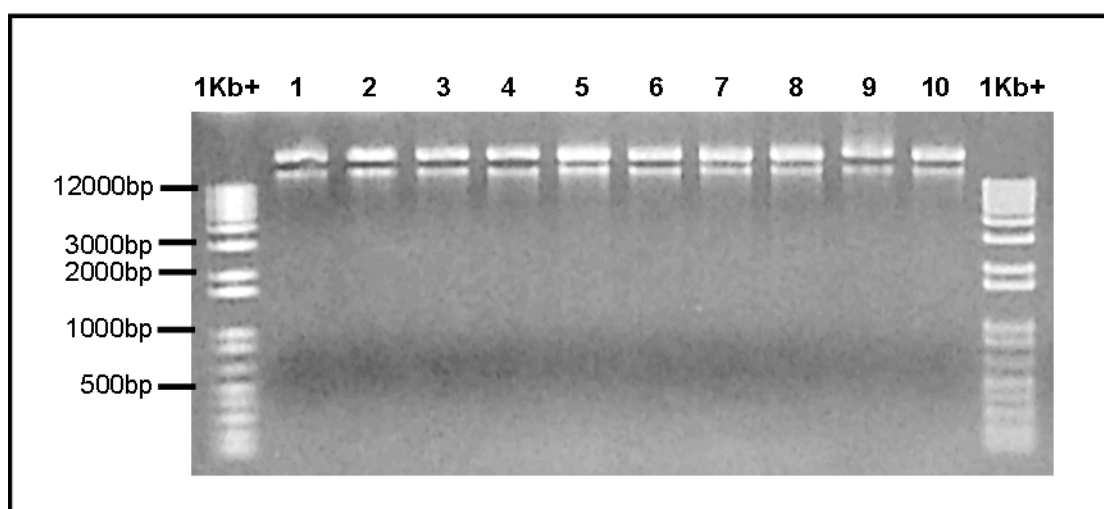


Figura 4.26 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das *minipreps* de cada clone confirmado por sequenciamento. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **1** – E402pBAC_cl.12.2, **2** – E405pBAC_cl.9.13, **3** – NS3-209pBAC_cl.85, **4** – NS3-435pBAC_cl.11.4, **5** – NS3-480pBAC_cl.9, **6** – E405/NS3-435_cl.3, **7** – E402/NS3-209_cl.17, **8** – E402/NS3-480_cl.89, **9** – E402/NS3-209/NS3-480_cl.27, **10** – pBACDV1.

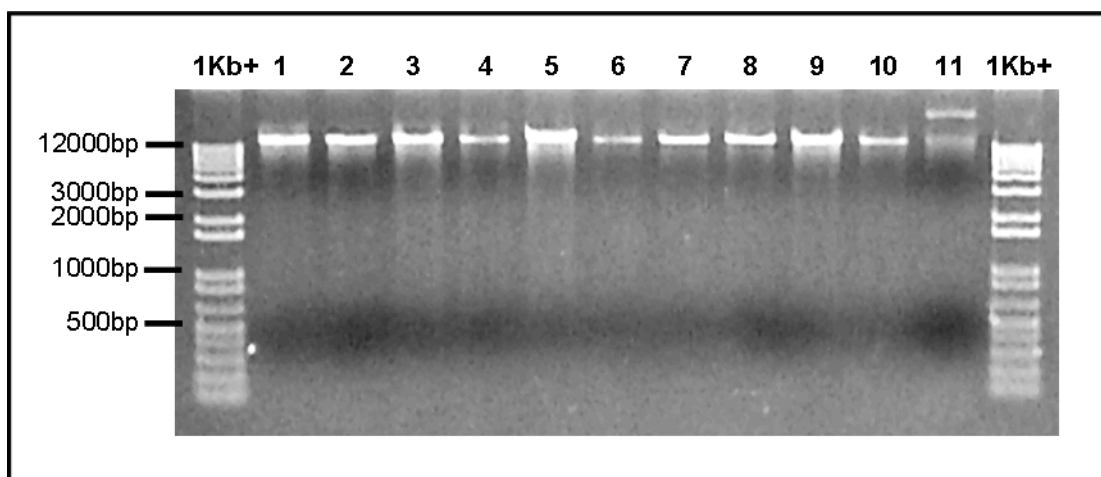


Figura 4.27 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das digestões SwaI das *minipreps* de cada clone confirmado por sequenciamento. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **1** – E402pBAC_cl.12.2, **2** – E405pBAC_cl.9.13, **3** – NS3-209pBAC_cl.85, **4** – NS3-435pBAC_cl.11.4, **5** – NS3-480pBAC_cl.9, **6** – E405/NS3-435_cl.3, **7** – E402/NS3-209_cl.17, **8** – E402/NS3-480_cl.89, **9** – E402/NS3-209/NS3-480_cl.27, **10** – pBACDV1, **11** – controle negativo (pBACDV1 não digerido).

O sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição SwaI está localizado logo após a sequência da ribozima do vírus da hepatite delta (HDV-RZ) e do sítio de terminação da T7 RNA polimerase (T7 term). As amostras de DNA clivadas foram utilizadas como molde para reações de síntese de RNA, utilizando o kit de transcrição *in vitro* T7 MEGAscript (Ambion) com adição de *cap*. A transcrição é iniciada no sítio do promotor da T7 RNA polimerase localizado imediatamente antes do início do genoma viral e é finalizada no sítio T7 term, transcrevendo inclusive a sequência HDV-RZ. A ribozima, por ser um RNA com atividade catalítica, é autoclivada, liberando o RNA exatamente no último nucleotídeo do genoma viral, o que é de extrema importância para a viabilidade/estabilidade do RNA para o processo de replicação viral.

Após a reação, as amostras de RNA transcritas foram observadas em gel de agarose 0,8% livre de RNases para análise de sua integridade e concentração (Figura 4.28).

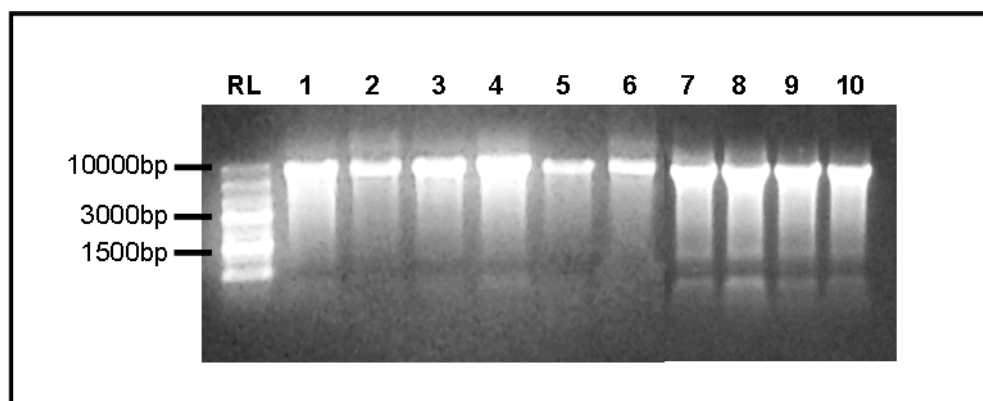


Figura 4.28 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos RNAs resultantes das transcrições *in vitro* de cada clone. **RL** – marcador de peso molecular 0.5-10Kb RNA (Invitrogen). **1** – E402pBAC_cl.12.2, **2** – E405pBAC_cl.9.13, **3** – NS3-209pBAC_cl.85, **4** – NS3-435pBAC_cl.11.4, **5** – NS3-480pBAC_cl.9, **6** – E405/NS3-435_cl.3, **7** – E402/NS3-209_cl.17, **8** – E402/NS3-480_cl.89, **9** – E402/NS3-209/NS3-480_cl.27, **10** – pBACDV1.

4.3.2 Determinação da linhagem celular e método de transfecção

Para determinar a linhagem celular mais adequada e o melhor método de transfecção dos RNAs, foi realizada uma etapa de padronização, na qual o RNA do clone pBACDV1 foi utilizado. Foram avaliados protocolos de transfecção por lipossomo, utilizando lipofectina, e eletroporação em culturas de células de inseto (C6/36) e mamífero (BHK). A seleção das metodologias e linhagens celulares para teste foi baseada em experiências anteriores.

As células foram transfectadas com os dois métodos e os sobrenadantes das culturas foram recolhidos nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas pós-transfecção para avaliação da eficácia do método através da produção de progênie viral pela técnica de titulação viral por imunodetecção de foco. Os títulos virais de cada ponto foram utilizados para gerar gráficos para melhor visualização (Figura 4.29).

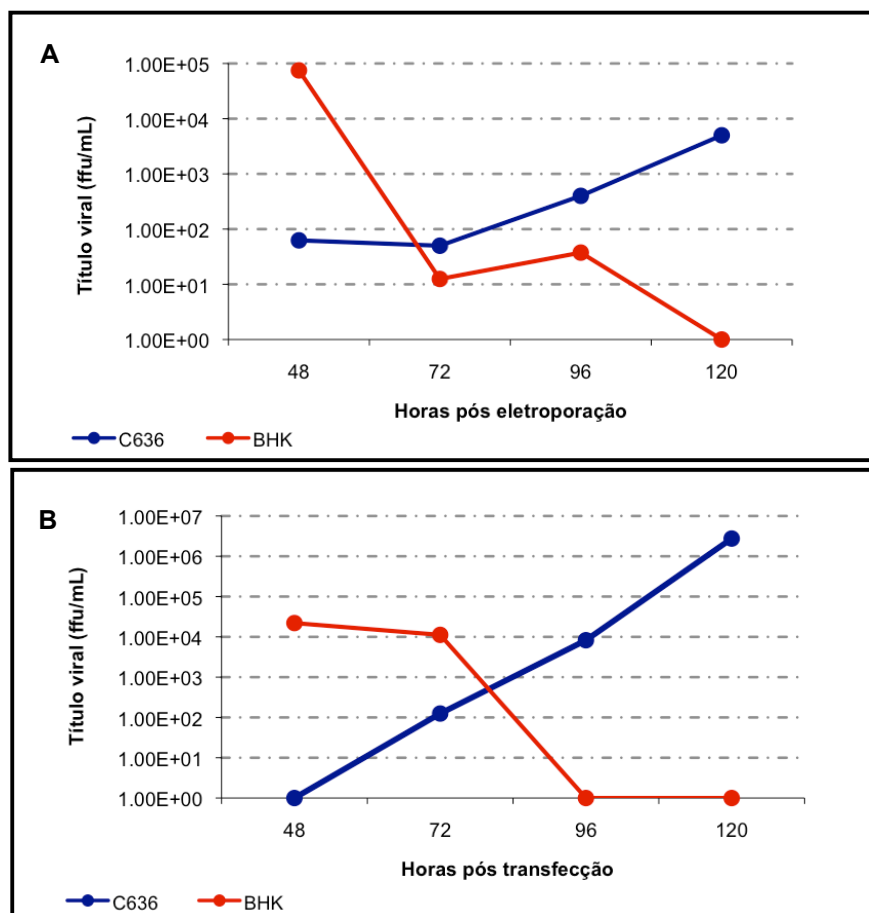


Figura 4.29 – Representação gráfica dos títulos virais obtidos nas diferentes metodologias de transfecção em células de inseto (em azul) e mamífero (em vermelho). **A** – Títulos resultantes do protocolo de eletroporação. **B** – Títulos resultantes do protocolo de transfecção por lipossomo.

Foi possível observar que as culturas células de inseto C6/36 apresentaram um padrão crescente de título viral dentro do intervalo de tempo analisado, enquanto as culturas de células de mamífero BHK apresentaram um padrão decrescente ao longo do tempo. A técnica de transfecção por lipossomo resultou em um maior título viral em 120h pós-transfecção quando comparada com a técnica de eletroporação. Baseado nestas análises foi escolhida a metodologia de transfecção com lipofectina em culturas de células de inseto C6/36 para a continuidade do trabalho.

4.3.3 Transfecção de RNA recombinante em células de inseto C6/36

Os RNAs recombinantes transcritos (Figura 4.27) foram utilizados para transfecção em células de inseto C6/36 utilizando protocolo com lipofectina. Os RNAs eram misturados com o lipossomo e a mistura era incubada com a cultura por um período de 3 horas para sua adsorção. Após este período, o inóculo era substituído por meio de cultura completo, e a cultura mantida a temperatura adequada. Os sobrenadantes foram recolhidos nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas pós transfecção, aliquotados e armazenados a -70°C para sua posterior titulação.

Para avaliar e quantificar a produção de progênie viral, os sobrenadantes recolhidos foram titulados pela técnica de titulação viral por imunodeteção de foco. Os títulos virais de cada ponto foram utilizados para gerar um gráfico para melhor visualização. A Figura 4.30 mostra o gráfico com o crescimento gradual dos títulos virais dos vírus recombinantes ao longo das horas pós transfecção.

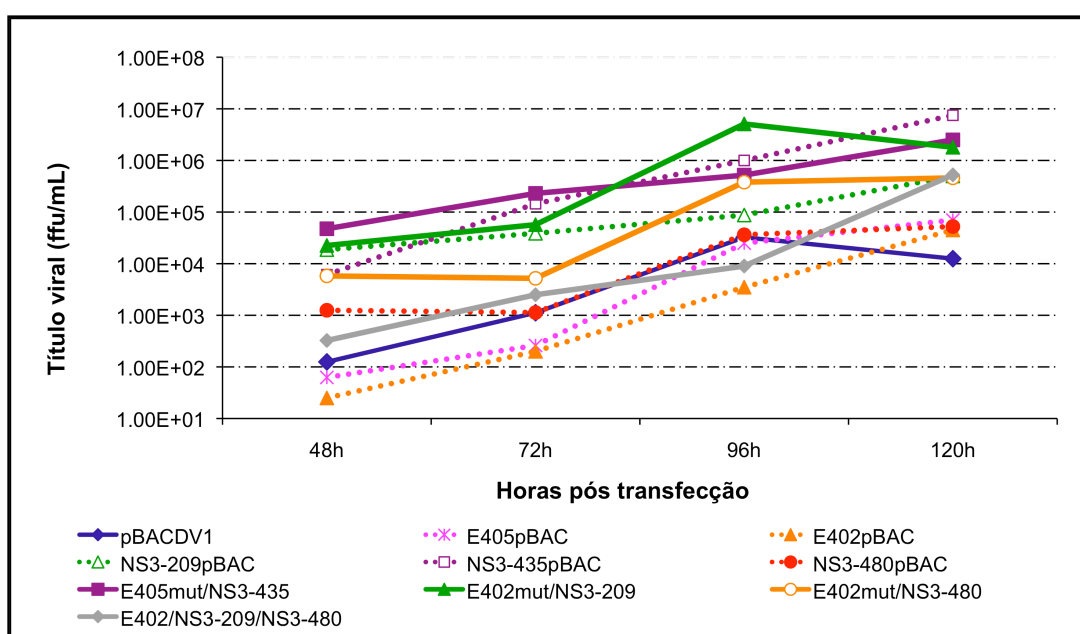


Figura 4.30 – Representação gráfica dos títulos virais obtidos na transfecção dos clones recombinantes em cultura de células de inseto.

4.3.4 Amplificação de estoques virais em cultura de células de inseto e purificação viral em gradiente de sacarose

Os vírus recombinantes foram amplificados em células de inseto, a fim de gerar estoques virais de trabalho das amostras transfectadas, produzindo quantidades suficientes de vírus de mesmo lote para utilização nos experimentos subsequentes. Para tanto, foram feitas duas passagens em células C6/36, infecções com MOI de 0.01, a partir do sobrenadante recolhido na transfecção. Os sobrenadantes da primeira passagem foram recuperados e utilizados tanto para determinação de seu título, quanto para a infecção subsequente (segunda passagem). As infecções foram acompanhadas de 5 a 7 dias e foram avaliadas quanto ao aparecimento de efeito citopático (CPE) quando comparadas com o controle negativo, *mock*. Os sobrenadantes da segunda passagem foram recuperados e precipitados com PEG e NaCl para sua purificação por gradientes de sacarose, a fim de se obter estoques virais purificados e concentrados. Os estoques virais foram aliquotados e seus títulos determinados. Os títulos virais das duas passagens foram utilizados para obter um gráfico para melhor visualização (Figura 4.31).

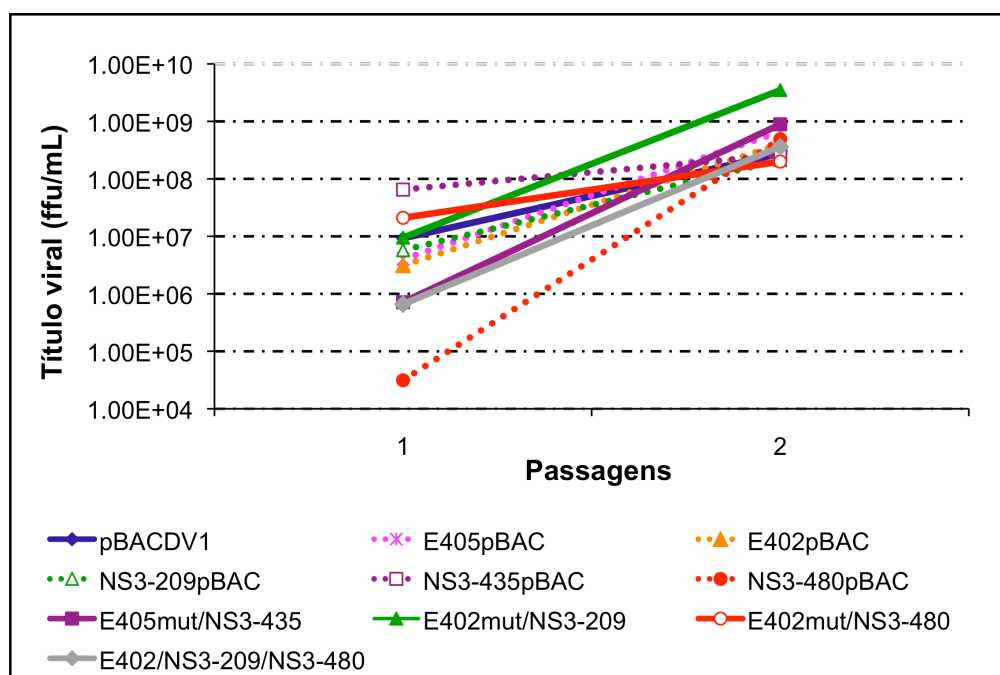


Figura 4.31 – Representação gráfica dos títulos virais obtidos nas passagens 1 e 2 (pós-gradiente) dos vírus gerados a partir dos clones recombinantes, em cultura de células de inseto.

4.4 Caracterização genética completa dos vírus recombinantes

Após a produção de estoques virais purificados em gradiente de sacarose a partir dos clones recombinantes, foi realizada a extração de RNA para amplificação e confirmação da sequência nucleotídica completa do genoma dos vírus.

Para tanto, uma alíquota de 100µL proveniente dos vírus purificados em gradientes de sacarose foi utilizada para extração de RNA. Os RNAs foram convertidos em cDNA na presença de *Random Primer* (100pmol/µL – Invitrogen), que foram utilizados como molde para amplificação por PCR de fragmentos que compreendiam o genoma completo dos vírus (Figura 4.32).

Devido à presença de estruturas secundárias, muitas vezes a amplificação da região 3'UTR não é eficiente, assim sendo, não foi possível realizar a amplificação do fragmento 6a (Quadro 3.6 – item 3.2.8) na primeira tentativa para alguns clones (E402pBAC_cl.12.2, E405pBAC_cl.9.13 e NS3-435pBAC_cl.11.4). No entanto, esta região foi amplificada com as estratégias de amplificação dos fragmentos 6b e 7 (Quadro 3.6 – item 3.2.8) (resultado não mostrado).

Todos os fragmentos foram purificados com kit comercial, por extração de gel de agarose e foram enviados para sequenciamento na Macrogen (Seoul, Coréia do Sul) (Quadro 3.7 – item 3.2.8). As sequências nucleotídicas resultantes foram analisadas e organizadas em uma sequência consenso (*contig*) utilizando os programas Phred/Phrap/Consed. As sequências consenso de cada clone foram alinhadas utilizando o software CLUSTALx e o alinhamento foi analisado e editado pelo software GENEDOC para melhor visualização das diferenças de nucleotídeos e aminoácidos entre os vírus mutados.

As Figuras 4.33A e 4.33B mostram o alinhamento das sequências de aminoácidos dos 10 vírus recombinantes gerados neste trabalho na seguinte ordem: pBACDV1, E402pBAC_cl.12.2, E405pBAC_cl.9.13, NS3-209pBAC_cl.85, NS3-435pBAC_cl.11.4, NS3-480pBAC_cl.9, E402/NS3-209_cl.17, E402/NS3-480_cl.89, E405/NS3-435_cl.3 e E402/NS3-209/NS3-480_cl.27. É possível observar, em preto, as regiões conservadas entre as sequências. As diferenças de aminoácidos aparecem em branco e foram destacadas em quadros vermelhos com sua respectiva identificação. Todas as amostras possuíam apenas a mutação em estudo, não apresentando outras mutações aleatórias, com exceção da amostra E402/NS3-

209/NS3-480_cl.27 que possui uma mutação na posição do nucleotídeo 4.257, localizado na proteína NS2b, a qual modifica o aminoácido Valina para Alanina, destacado em azul. Esta mutação extra inviabilizou a utilização do clone, pois pode mascarar ou modificar os resultados, uma vez que a finalidade do estudo é inferir o potencial papel de cada mutação individual ou em conjunto dentro do contexto do fenótipo da neurovirulência. Portanto, este clone foi descartado e a sua clonagem foi reiniciada pela substituição do fragmento MluI/BsiWI contendo a mutação NS3-209 dentro do clone E402/NS3-480_cl.89.

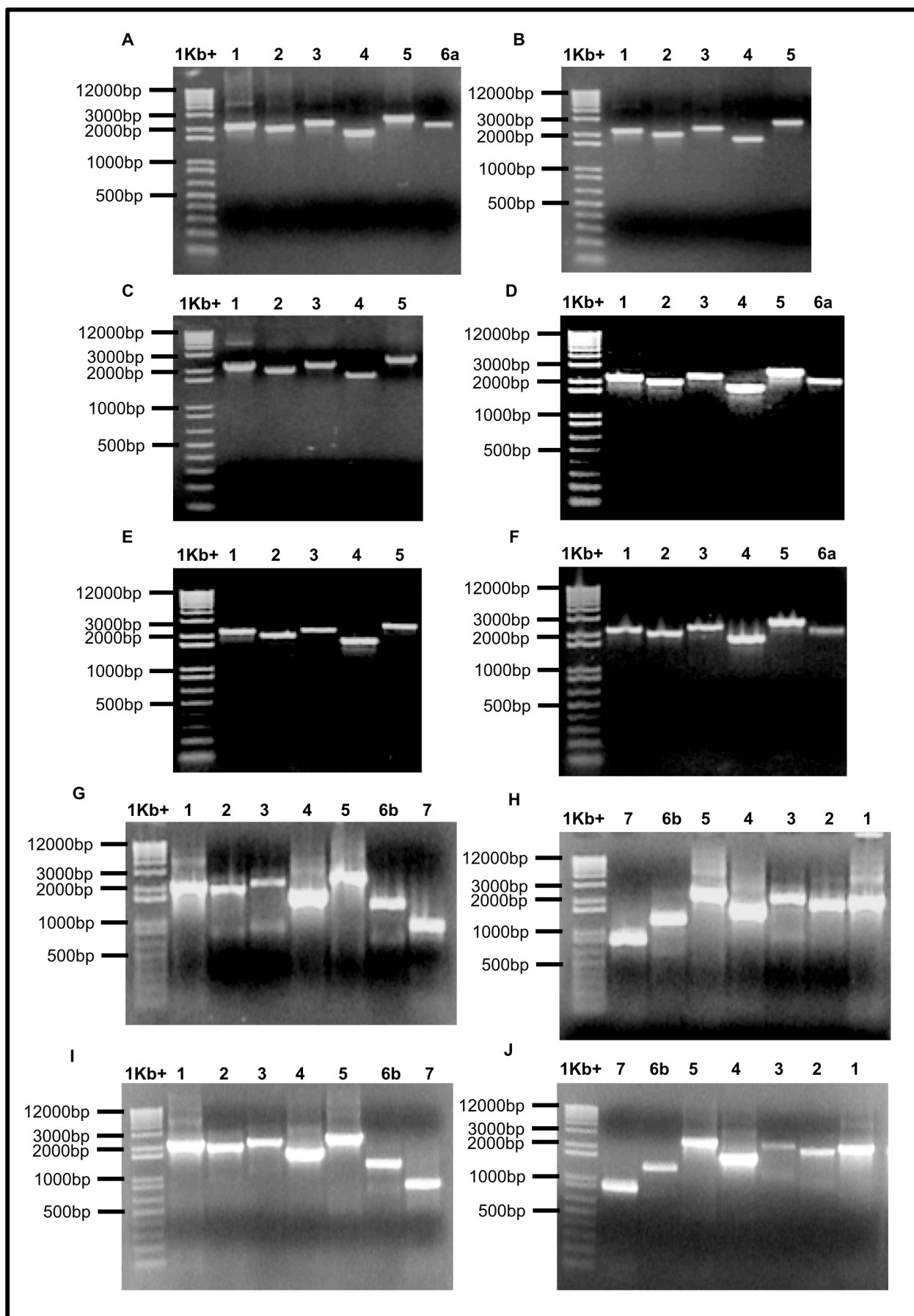


Figura 4.32 – Eletroforeses em gel de agarose 0,8% das amplificações por PCR dos genomas completos dos vírus recombinantes. A numeração dos fragmentos segue a mesma da Quadro 3.6 – item 3.2.8. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen). **A** – pBACDV1, **B** – E402pBAC_cl.12.2, **C** – E405pBAC_cl.9.13, **D** – NS3-209pBAC_cl.85, **E** – NS3-435pBAC_cl.11.4, **F** – NS3-480pBAC_cl.9, **G** – E405/NS3-435_cl.3, **H** – E402/NS3-209_cl.17, **I** – E402/NS3-480_cl.89, **J** – E402/NS3-209/NS3-480_cl.27.

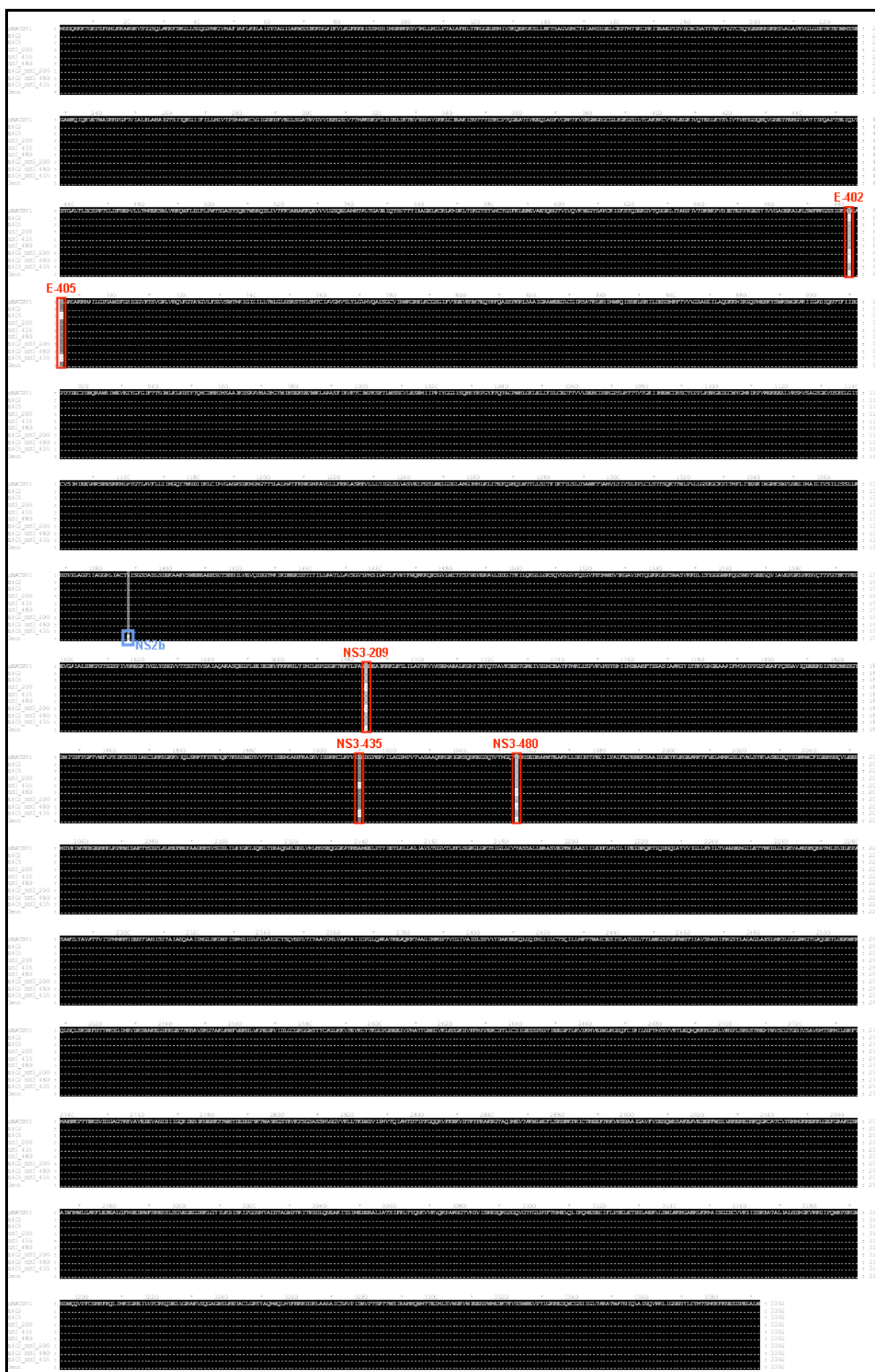


Figura 4.33A – Alinhamento de aminoácidos das amostras pBACDV1, E402pBAC_cl.12.2, E405pBAC_cl.9.13, NS3-209pBAC_cl.85, NS3-435pBAC_cl.11.4, NS3-480pBAC_cl.9, E402/NS3-209_cl.17, E402/NS3-480_cl.89, E405/NS3-435_cl.3 e E402/NS3-209/NS3-480_cl.27.

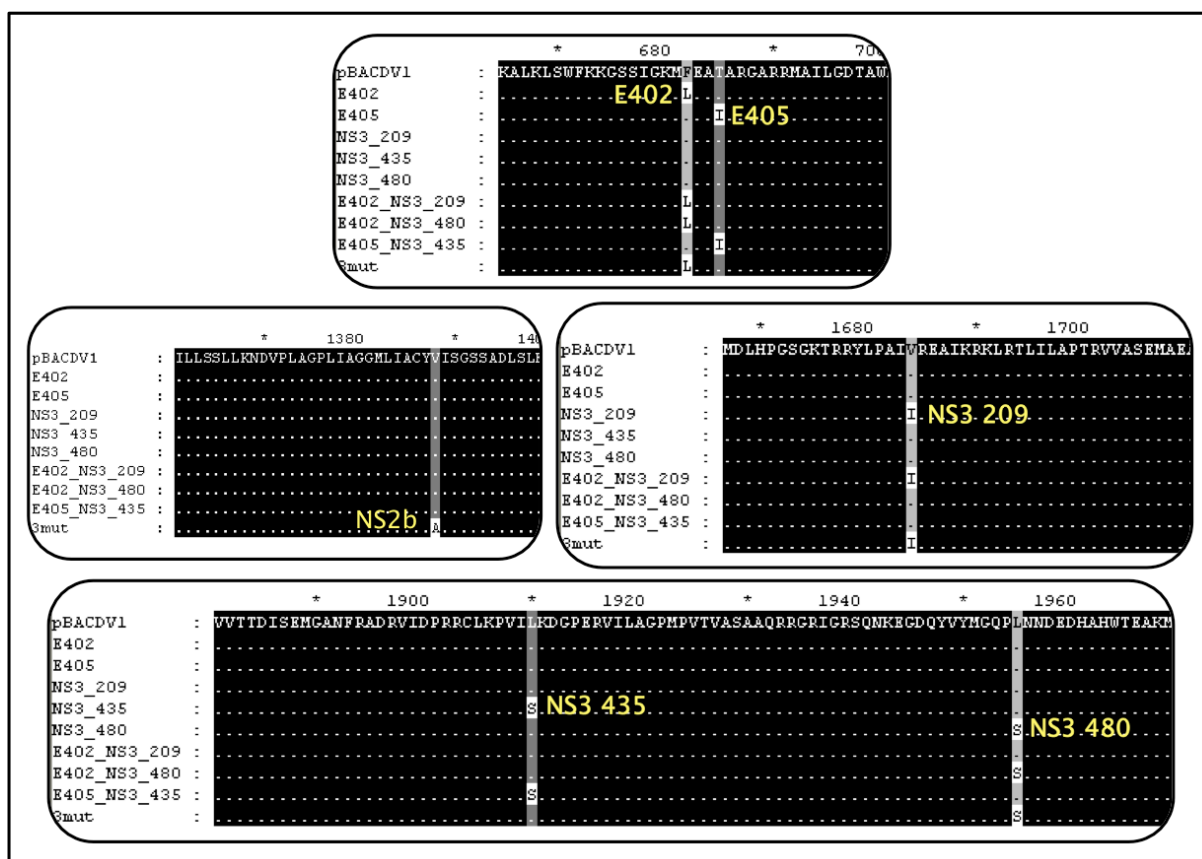


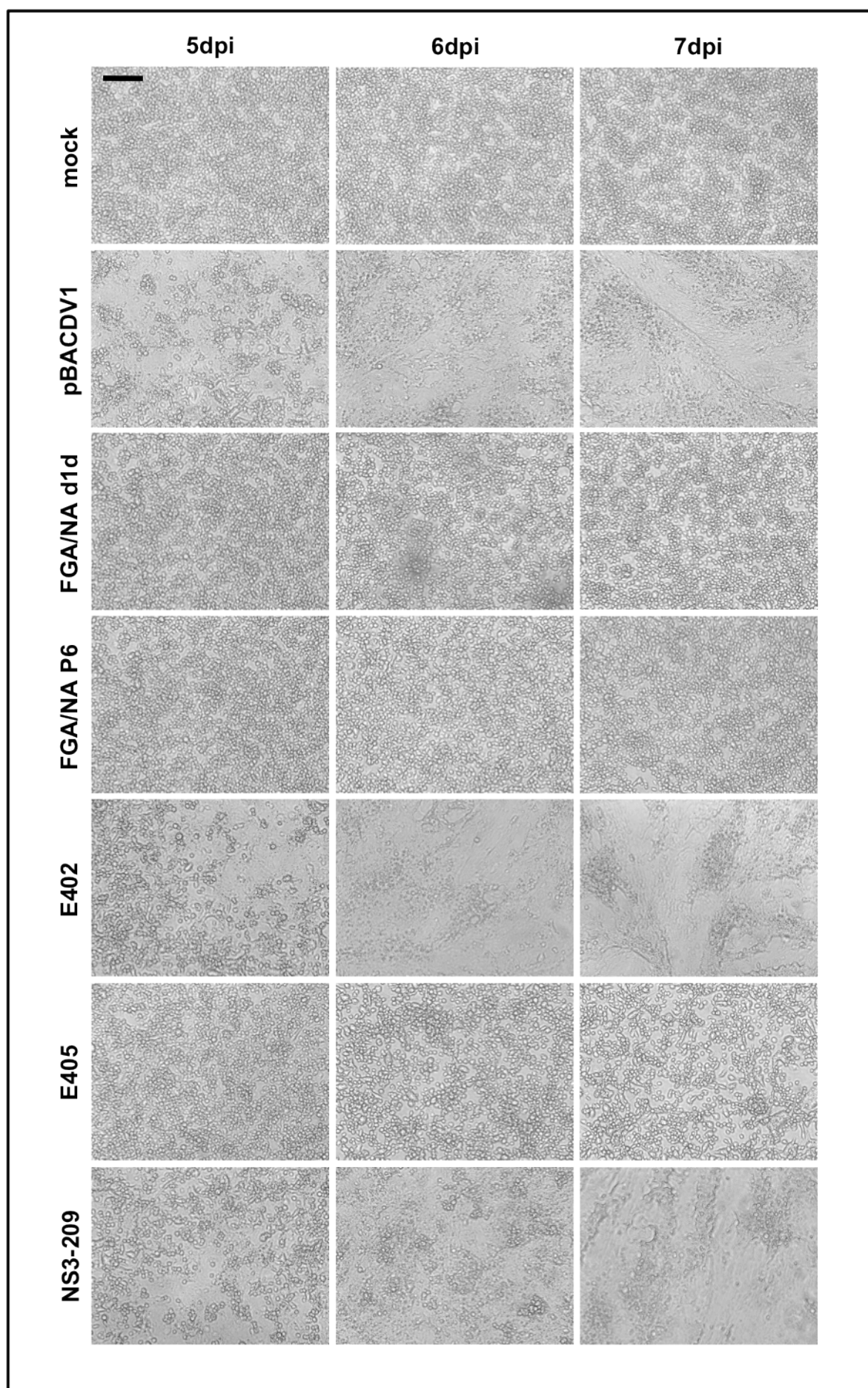
Figura 4.33B – Ampliação do alinhamento de aminoácidos das amostras pBACDV1, E402pBAC_cl.12.2, E405pBAC_cl.9.13, NS3-209pBAC_cl.85, NS3-435pBAC_cl.11.4, NS3-480pBAC_cl.9, E402/NS3-209_cl.17, E402/NS3-480_cl.89, E405/NS3-435_cl.3 e E402/NS3-209/NS3-480_cl.27, destacando as regiões de localização das mutações estudadas.

4.5 Análise comparativa do efeito citopático produzido pelos vírus recombinantes em culturas de células de inseto C6/36

As cepas virais pBACDV1 (cepa BR/90), FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6 utilizadas neste trabalho diferem quanto a produção de efeito citopático (CPE) em células de inseto. Visando analisar a influência das mutações na possível alteração do fenótipo em culturas de células de inseto, infecções com todos os vírus em paralelo foram acompanhadas por 5 a 7 dias e fotografadas.

Na Figura 4.34 é possível observar que as culturas infectadas com as cepas FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6 permanecem sem CPE, não apresentando diferenças visuais quando comparadas com as culturas infectadas com *mock*. Entretanto, as infecções com o vírus pBACDV1 começam a apresentar alguns pontos de fusão celular já com 4 dias pós infecção, tomando grandes proporções ao longo do tempo (5 a 7 dias).

Quando as infecções com os vírus mutados foram analisadas, foi possível observar fusão celular em quase todas as amostras, semelhante ao pBACDV1. Porém, interessante, os vírus E405 e E405/NS3-435 apresentam uma alteração no fenótipo de fusão, não apresentando CPE, semelhante ao vírus FGA/NA-d1d, de onde as mutações foram identificadas. É importante ressaltar, que o vírus contendo apenas a mutação NS3-435 apresenta fusão celular, mas quando combinado com a mutação E405, deixa de apresentar este efeito na cultura celular.



continua na próxima página...

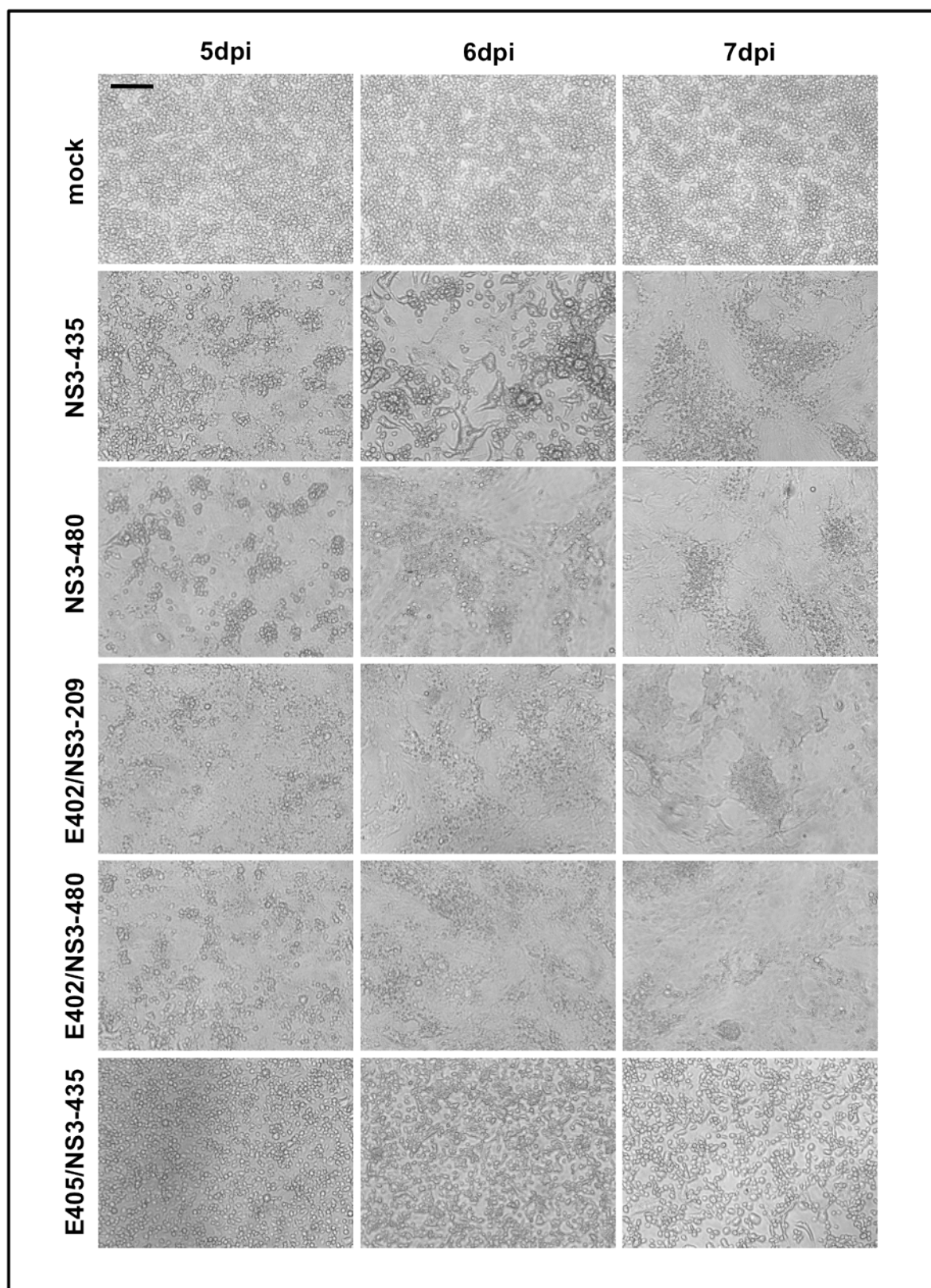
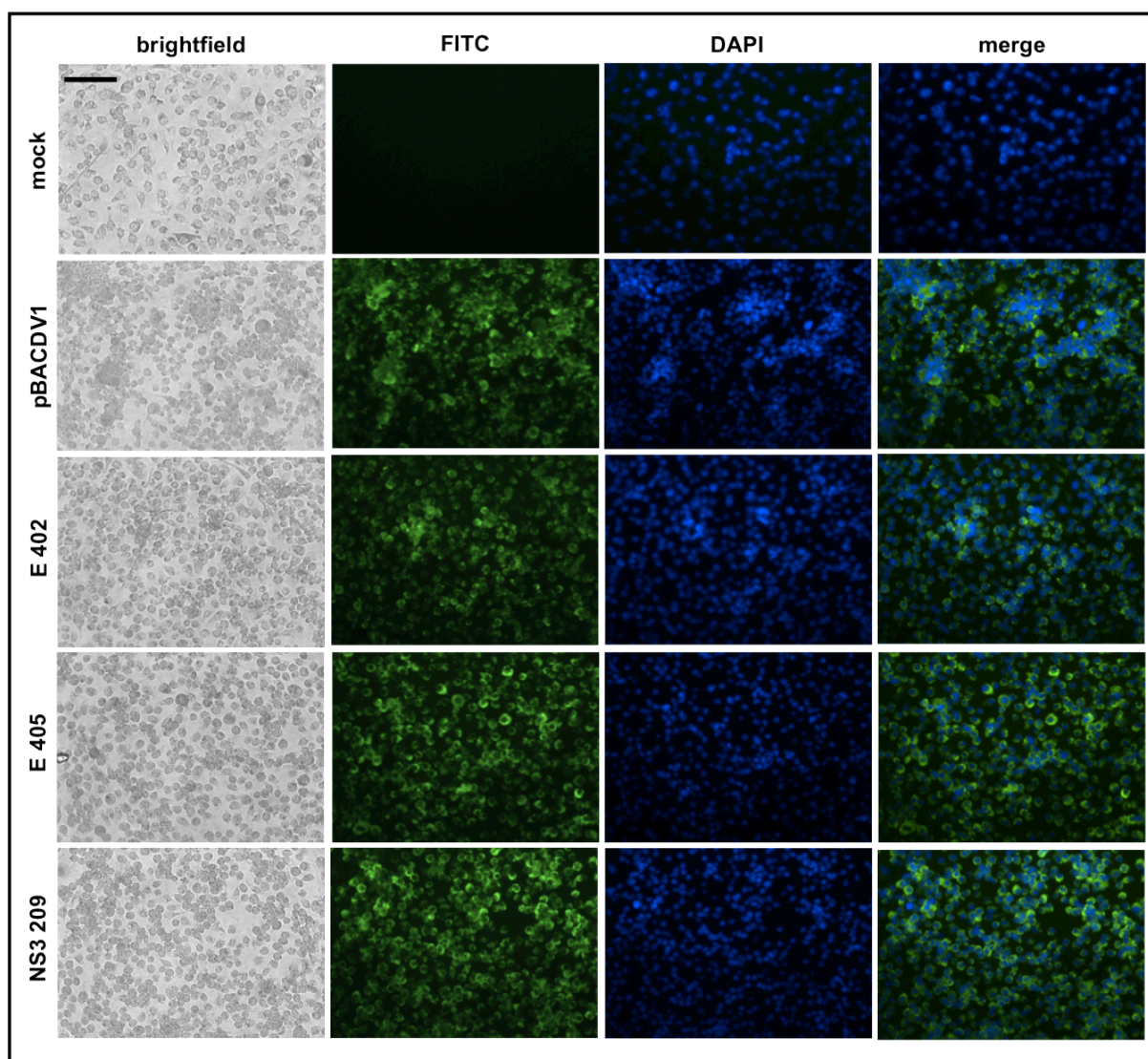


Figura 4.34 – Efeito citopático produzido pelos vírus recombinantes em cultura de células de inseto C6/36 nos tempos de 5, 6 e 7 dias pós-infecção. Aumento de 200x e barra equivalente a 120µm.

4.6 Análise comparativa do padrão de infecção dos vírus recombinantes por imunofluorescência indireta em cultura de células de inseto C6/36

Os vírus recombinantes foram utilizados para infectar células de inseto e avaliar a sua habilidade de infecção. A Figura 4.35 mostra o padrão de infecção destes vírus, mostrando que todos os vírus recombinantes infectam eficientemente células de inseto da linhagem C6/36, sendo capaz de sintetizar proteínas virais, evidenciado pelo padrão de infecção nas culturas com 5 dpi.



continua na próxima página...

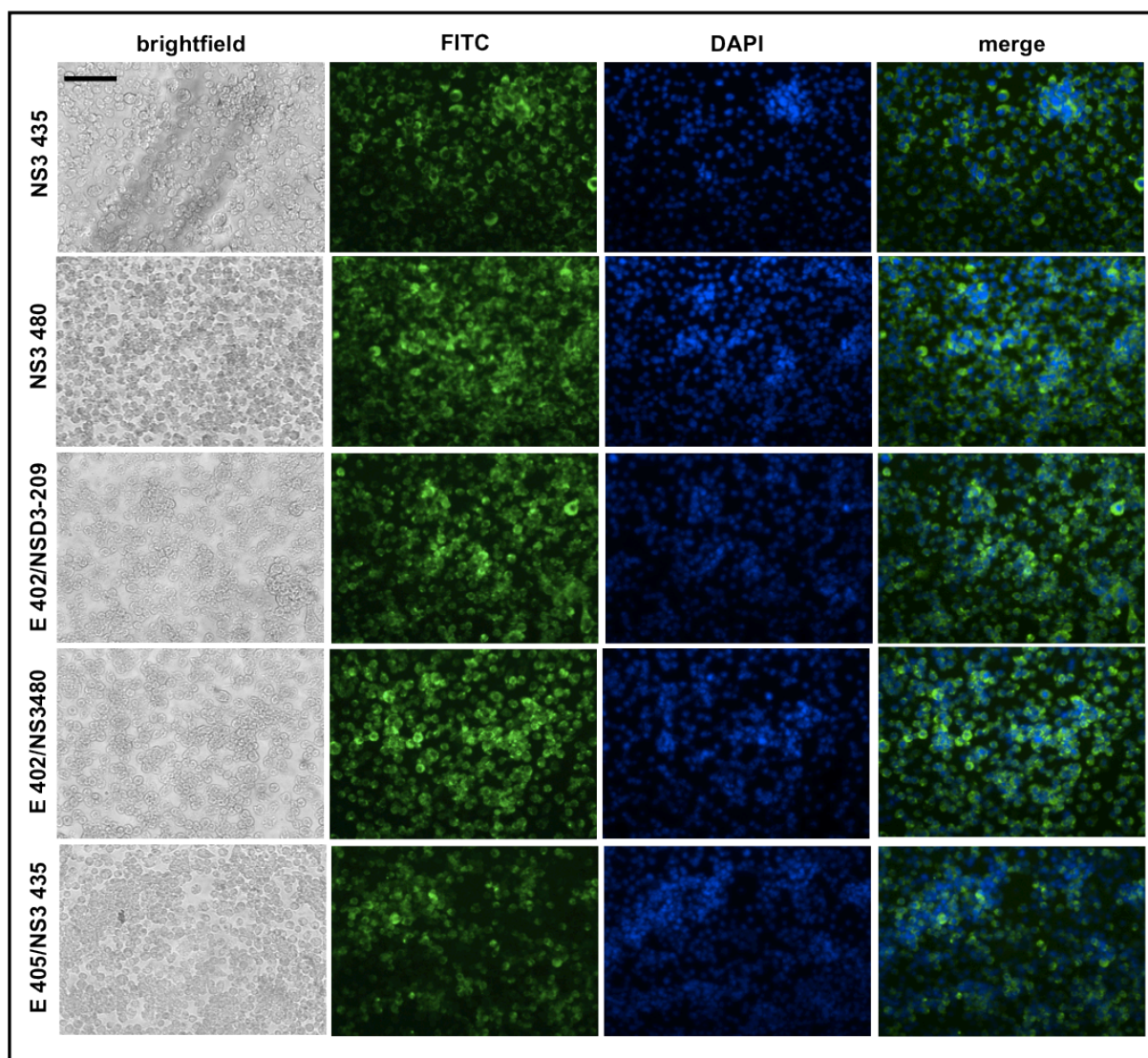


Figura 4.35 Análise comparativa da reação de imunofluorescência dos vírus recombinantes em cultura de células de inseto C6/36 com 5 dias pós-infecção. Culturas celulares marcadas com anticorpo 4G2, seguido de anti-camundongo conjugado com FITC. Aumento de 400x e barra equivalente a 70µm.

4.7 Ensaio de DL₅₀ para inoculação do genoma infeccioso pBACDV1, vírus recombinantes e controles, em camundongos neonatos

Para dar início à inoculação dos camundongos com os vírus recombinantes purificados, foi necessário estabelecer a dose ideal do inóculo para o genoma infeccioso pBACDV1, uma vez que é uma cepa diferente dos demais vírus já estudados em modelo murino em nosso laboratório. Para tanto, foi realizado um ensaio de DL₅₀ para determinação da dose letal desta cepa.

No grupo inoculado com a maior dose (1.0×10^5 ffu), a taxa de mortalidade dos animais atingiu 69.2%, enquanto no grupo dos animais inoculados com a dose 1.0×10^4 ffu, apenas 22.3% morreram. Todos os animais inoculados com as doses mais baixas (1.0×10^3 ffu e 1.0×10^2 ffu) e com o *mock* sobreviveram (Figura 4.36).

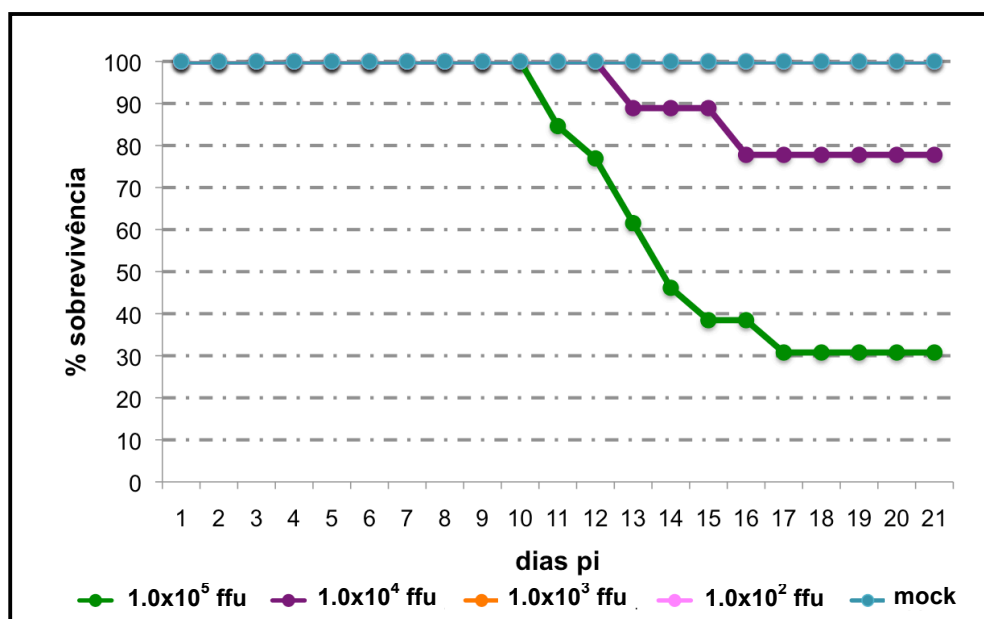


Figura 4.36 – Representação gráfica da sobrevivência dos animais inoculados i.c. com pBACDV1, no ensaio de DL₅₀. Os animais foram acompanhados por 21 dias.

A dose viral para inoculação foi determinada sendo 10^{-2} (dois logs a menos) do valor obtido pelo ensaio de DL₅₀, como descrito anteriormente em DESPRÈS *et al.* 1998. Portanto, baseado nas porcentagens de mortalidade dos animais inoculados com pBACDV1, ficou estabelecida a dose de $1.0 \times 10^{2.75}$ ffu para

inoculação dos vírus recombinantes nos ensaios da avaliação do potencial papel das mutações no processo de neuropatogênese.

Os vírus recombinantes, o pBACDV1 e o *mock* foram inoculados i.c. em camundongos *Swiss* neonatos com a dose estabelecida, e os animais foram observados por um período de 21 dias para análises de morbidade e mortalidade (Figura 4.37).

Os grupos de animais inoculados com *mock*, pBACDV1, e com os vírus contendo as mutações E402, E405, NS3-209 e E402/NS3-209 exibiram comportamento normal durante o período analisado. Entretanto, todos os animais inoculados com os vírus NS3-435, NS3-480, E405/NS3-435 e E402/NS3-480 desenvolveram sintomas similares aos das cepas neurovirulentas FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6, como sinais de encefalite e paralisia parcial dos membros inferiores, iniciando entre os dias 9 e 10 pós-inoculação.

As taxas de mortalidade mostraram que 27% dos animais inoculados com o vírus NS3-435 morreram, enquanto os demais animais do mesmo grupo se recuperaram completamente dos sinais de doença após 21dpi. Já 51% dos animais inoculados com o vírus NS3-480 morreram em consequência da doença (Figura 4.37). Estes resultados sugerem o papel destas mutações no fenótipo de neurovirulência viral em camundongos. Além disso, no grupo de animais inoculado com o vírus contendo as mutações E405/NS3-435, apenas 29% sobreviveram (taxa de mortalidade próxima de 70%), enquanto o vírus E402/NS3-480 foi responsável pela morte de 100% dos animais (Figura 4.37), evidenciando um efeito sinérgico das mutações na doença e morte dos animais.

Estes resultados evidenciam que, as mutações E402 e E405 quando ensaiadas de forma isolada, não foram suficientes para causar doença ou morte dos animais, mas quando combinadas com as mutações da proteína NS3, desempenham um papel importante desencadeando doença neurológica e morte. Outro dado interessante é observado nas taxas de mortalidade dos vírus recombinantes E405/NS3-435 e E402/NS3-480, que seguem o mesmo padrão de cepas neuroadaptadas, FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6 (Figura 4.37).

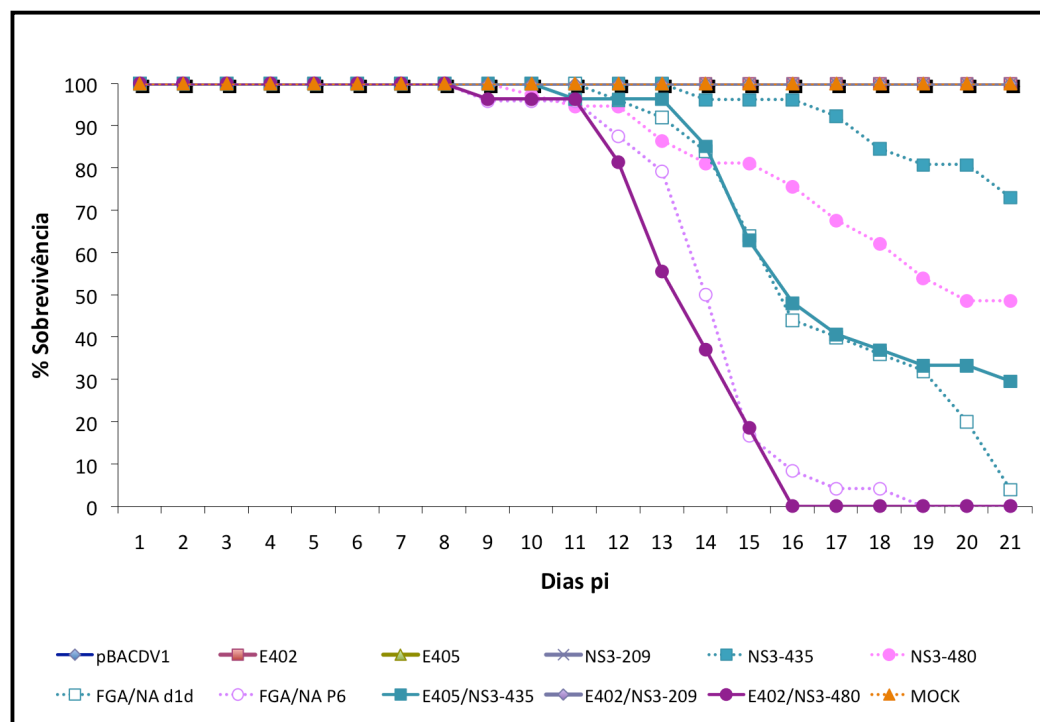


Figura 4.37 – Representação gráfica da sobrevivência dos animais inoculados com os vírus recombinantes e controles ao longo de 21 dias. Os camundongos infectados via i.c., foram observados por 21 dias.

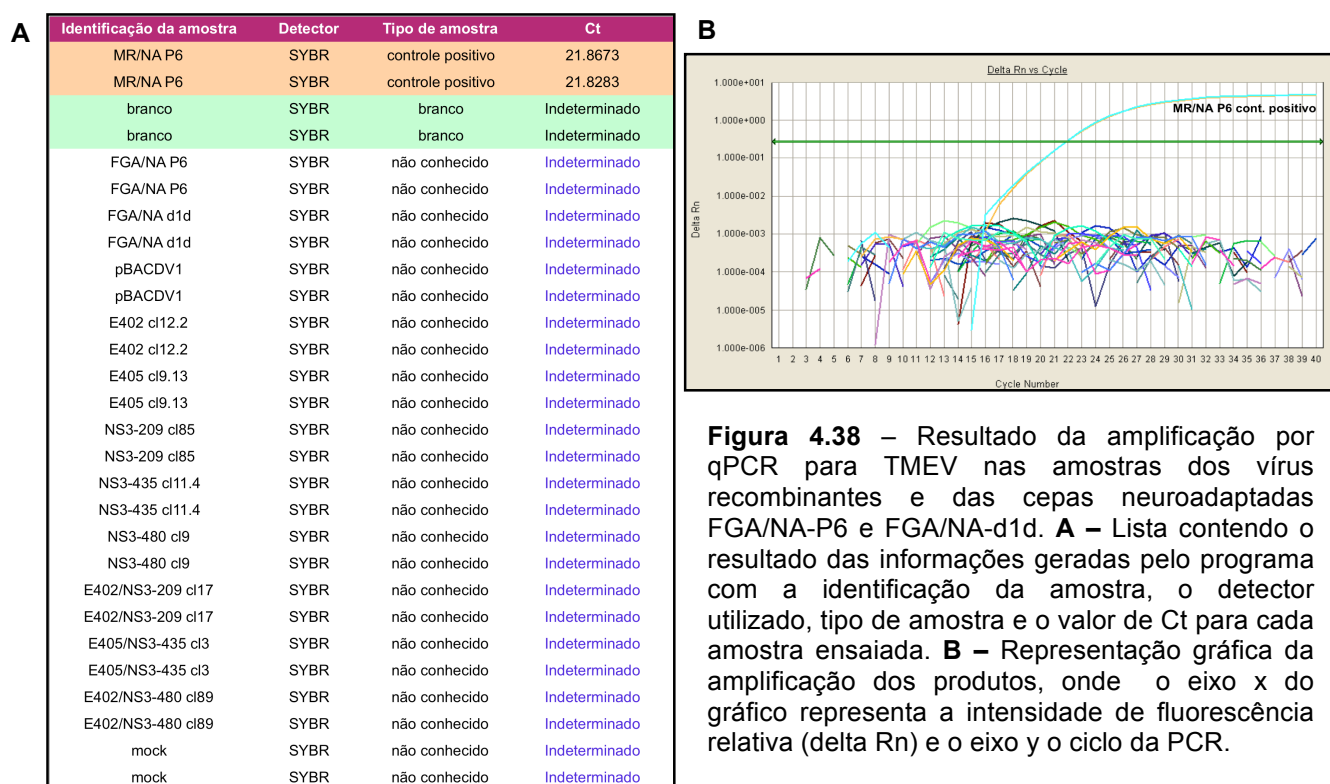
4.8 Exclusão de possível contaminação com vírus da encefalomielite murina de Theiler no sistema nervoso central de camundongos por PCR em tempo real

O vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) é um patógeno entérico de camundongos, pertencente ao gênero *Cardiovirus* da família *Picornaviridae* (RUECKERT, 1996), que possui cepas neurovirulentas (GDVII e FA) que induzem uma encefalite aguda e fatal, e cepas de baixa virulência (TO, WW, DA e BeAn) que persistem no sistema nervoso central, induzindo doença crônica, caracterizada por desmielinização (LIPTON, 1975).

Com o intuito de descartar uma eventual contaminação dos animais com outro vírus encefalítico, foram realizadas reações de amplificação por qPCR, com oligonucleotídeos específicos para TMEV, que é um contaminante freqüente em biotérios de experimentação, e para o qual, o teste estava disponível em nosso laboratório. As reações de qPCR foram realizadas a partir de amostras de RNAs extraídas dos tecidos cerebrais dos camundongos infectados com 8dpi. Como

controle da reação foi utilizado o RNA de uma amostra positiva, denominada MR/NA-P6.

A Figura 4.38A mostra a lista contendo o resultado das informações geradas pelo programa com a identificação da amostra, o detector utilizado, tipo de amostra e o valor de Ct para cada amostra ensaiada. A amostra MR/NA-P6 foi classificada como controle positivo, a reação com água (branco) como controle negativo e as demais amostras como “não conhecido”. O resultado, expresso em valor de Ct, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção. O valor de Ct foi indeterminado para todas as amostras analisadas, portanto negativo para infecção por TMEV. Os resultados são também facilmente visualizados pelos gráficos gerados no programa. A Figura 4.38B mostra a amplificação dos produtos em um gráfico que representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) em cada ciclo da PCR, onde é possível observar apenas a curva de amplificação do controle positivo MR/NA-P6, sendo as demais amostras negativas.



4.9 Análise das taxas de replicação viral dos vírus recombinantes no SNC de camundongos por PCR em tempo real

A fim de identificar e quantificar o RNA viral presente no tecido cerebral de camundongos infectados foram realizadas reações de amplificação por qPCR, com oligonucleotídeos específicos para DENV1, a partir de amostras de RNAs extraídas de tecidos do SNC de camundongos infectados com 8dpi. Os dados da amplificação do RNA viral foram normalizados utilizando-se o gene de expressão constitutiva gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Mus musculus* (*murGAPDH*).

Os valores obtidos foram utilizados para gerar um gráfico em logaritmo para uma melhor visualização dos dados. Na Figura 4.39 é possível observar que os vírus contendo as duplas mutações E402/NS3-480 e E405/NS3-435 apresentaram as maiores taxas de replicação viral no cérebro dos animais, quando comparados com as demais amostras, o que corrobora os resultados das taxas de mortalidade observadas nos ensaios *in vivo*.

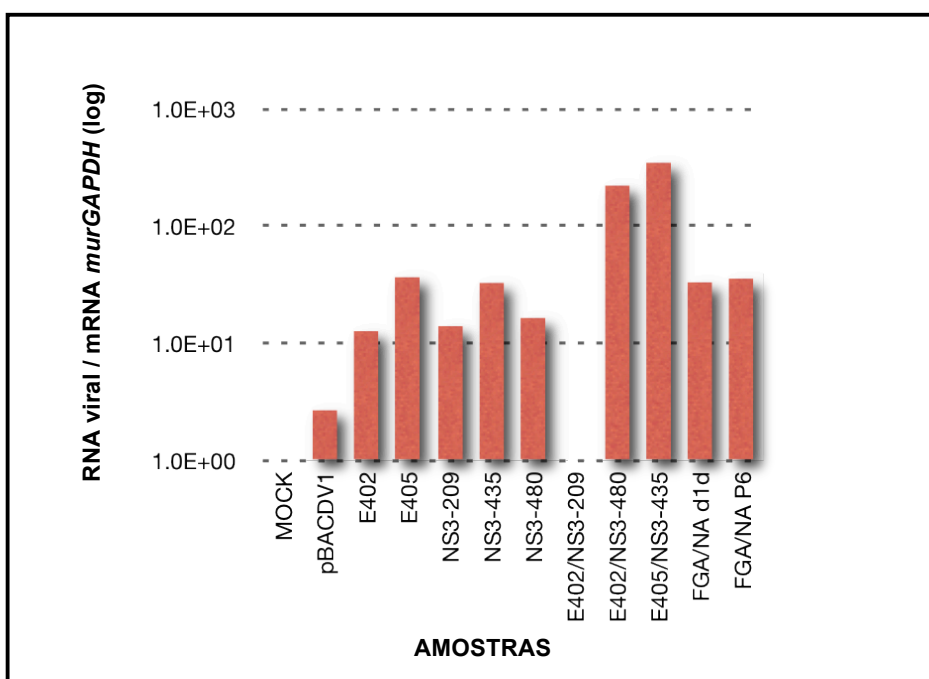


Figura 4.39 – Representação gráfica da amplificação do RNA viral por qPCR dos vírus recombinantes e das cepas neuroadaptadas FGA/NA-P6 e FGA/NA-d1d. Os resultados foram normalizados com a quantificação do gene murino GAPDH (*murGAPDH*).

4.10 Análise do perfil da expressão gênica no SNC de camundongos infectados com vírus recombinantes por PCR em tempo real

Dados anteriores do grupo (BORDIGNON *et al.*, 2008) revelaram o perfil da expressão gênica de vias diferencialmente expressas durante a infecção do SNC de camundongos com cepas neurovirulentas. Portanto, baseado nos dados obtidos previamente e com a finalidade de analisar e comparar o perfil da expressão gênica no tecido cerebral de camundongos infectados com os vírus recombinantes gerados neste estudo, foram escolhidos alguns genes representantes de vias previamente identificadas: sinalização de interferon (Irf1 – *interferon regulatory factor*), interferon alfa e beta, apresentação de antígeno (Psm8 – *proteasome subunit beta type 8*), ubiquitinação de proteína (Usp18 – *ubiquitin specific protease 18*), complemento (C1r – *component 1, r subcomponent*), e quimiocinas (Ccl5 – *ligante de quimiocina 5 – motivo C-C*). Os dados da amplificação dos mRNAs dos genes foram normalizados utilizando-se o gene de expressão constitutiva murGAPDH e a modulação dos genes foi calculada em relação ao vírus pBACDV1 (ver cálculo no item 3.4.5) (Figura 4.40).

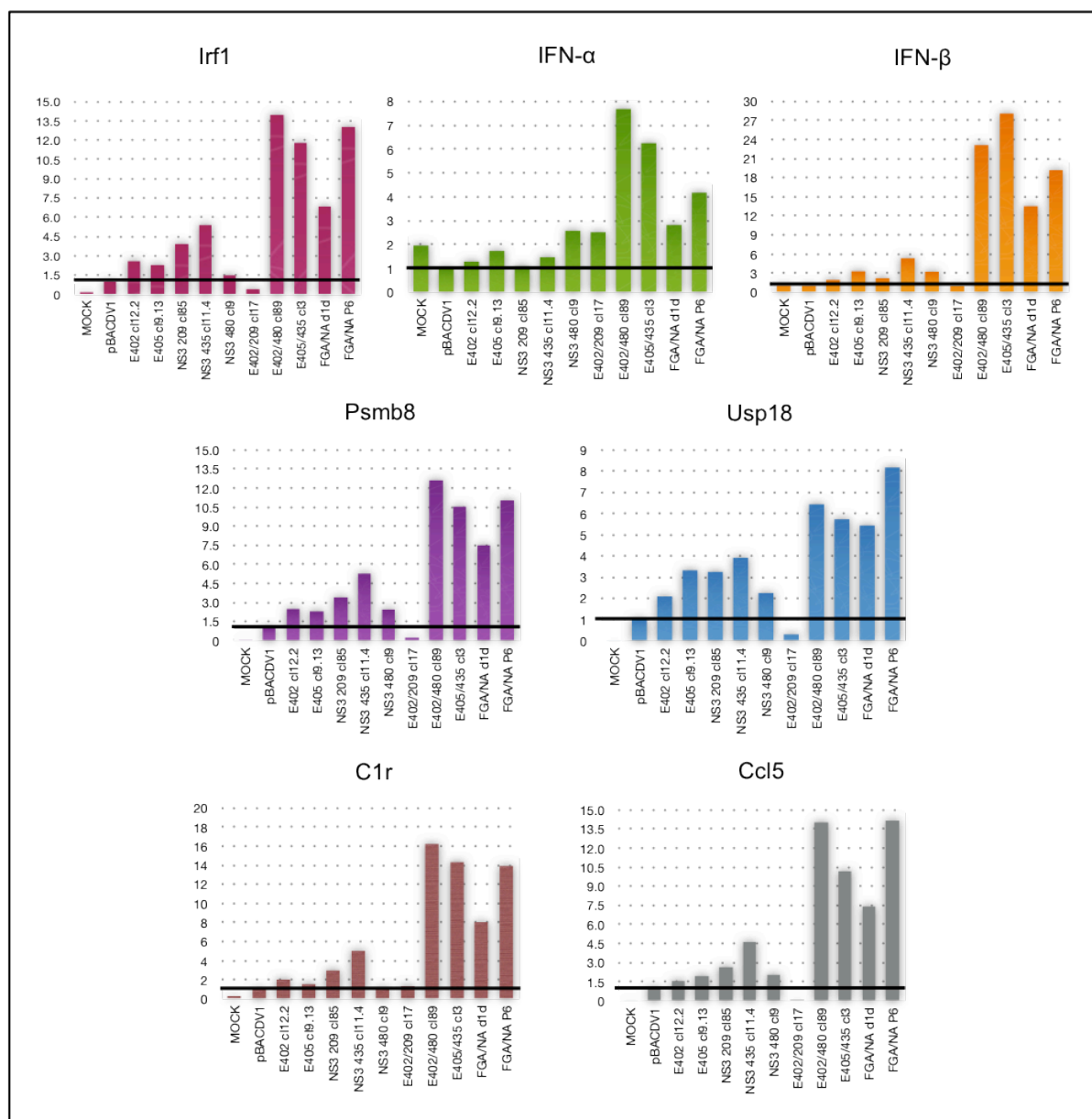


Figura 4.40 – Quantificação da modulação de genes diferencialmente expressos durante a infecção do SNC de camundongos com os vírus recombinantes gerados neste trabalho. No eixo x estão indicadas as amostras, e no eixo y, o valor da modulação dos genes normalizados com gene murGAPDH, expresso em número de vezes que o gene está aumentado para cada amostra. As linhas pretas delimitam a expressão dos genes para pBACDV1 em relação às demais amostras.

A linha preta marca o limiar entre a expressão gênica de pBACDV1 (1x modulado) em relação às demais amostras. É possível observar que, de uma maneira geral, a modulação da expressão gênica é maior na infecção com os vírus neuroadaptados (FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6) e com os vírus duplo-mutantes E402/NS3-480 e E405/NS3-435.

4.11 Análise histopatológica e imunohistoquímica do tecido cerebral dos camundongos infectados com vírus recombinantes

Para avaliar o comprometimento do SNC durante a infecção pelos vírus recombinantes, foram analisados o cérebros dos animais infectados, que foram coletados com 10 dpi, quando os animais começaram a apresentar sinais de doença e envolvimento do SNC, e foram imediatamente fixados por imersão em solução 10% formalina. Foi realizada a coloração com hematoxilina-eosina, para análise morfológica dos danos nos tecidos (Figura 4.43), e a marcação com anticorpo monoclonal anti-E, 4G2 flavivirus-específico, para a localização do antígeno viral nos tecidos (Figura 4.44).

A Figura 4.41 ilustra as regiões do cérebro, destacando em vermelho as regiões onde foram encontrado danos no tecido e marcação de proteína viral com anticorpo monoclonal nos cérebros dos camundongos infectados, quando analisado por histologia. Em verde, está representada a área do córtex frontal onde é realizado o inóculo dos vírus.

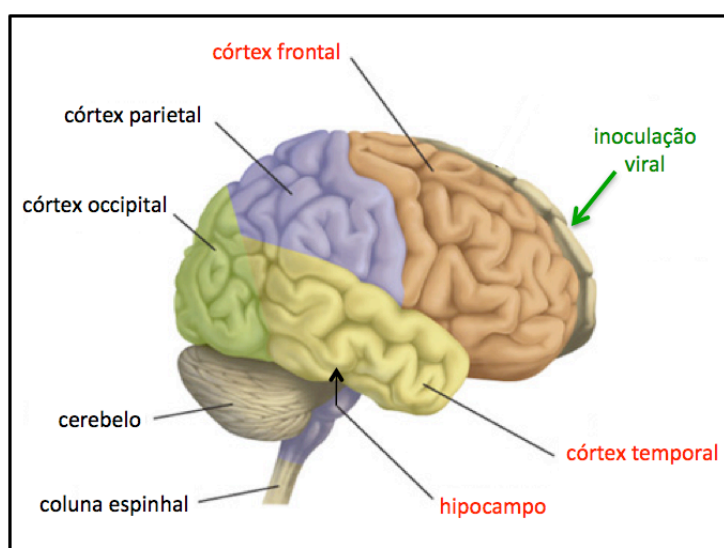


Figura 4.41 – Ilustração das regiões do cérebro e local de inoculação dos vírus. A região do hipocampo está internalizada e a seta aponta apenas a direção.

A análise do material revelou que todas as amostras infectadas com vírus apresentaram meningite, moderada a aguda, e os critérios que caracterizam encefalite, sendo graduada em discreta, moderada ou acentuada, de acordo com seu grau de comprometimento (Quadro 4.2). Os critérios que caracterizam uma encefalite são: necrose neuronal (neurônio vermelho), cerebrite (infiltrado mononuclear em vasos) e nódulo microglial, e estão representados na Figura 4.42.

AMOSTRA	MORTALIDADE (%)	CLASSIFICAÇÃO ENCEFALITE	MARCAÇÃO DE ANTÍGENO		EXTENSÃO DA LESÃO
			CÓRTEX	HIPOCAMPO	
FGA/NA P6	100	moderada/acentuada	+++	+++	Lesão acentuada com grande perda neuronal.
FGA/NA d1d	96	moderada/acentuada	+++	+++	Perda neuronal na região do córtex fronto-parietal e lesão acentuada no hipocampo.
mock	0	nenhuma	-	-	Sem lesão.
pBACDV1	0	discreta	+	-	Lesão discreta não classificada como encefalite.
E402	0	moderada	+	+	Lesão moderada com pouca encefalite e lesão no hipocampo.
E405	0	moderada	+	+	Lesão frontal com perda neuronal acentuada em um dos hemisférios e lesão discreta no hipocampo.
NS3-209	0	discreta	+	+	Lesão discreta não classificada como encefalite.
NS3-435	27	moderada	+++	+	Lesão moderada no córtex frontal e temporal.
NS3-480	51	acentuada	++	++	Lesão acentuada no córtex fronto-parietal e parietal.
E402/NS3-209	0	discreta	+	-	Lesão discreta.
E402/NS3-480	100	acentuada	+++	+++	Lesão acentuada no córtex fronto-parietal e parietal.
E405/NS3-435	70	moderada	+++	++	Lesão moderada no córtex frontal e temporal.

Quadro 4.2 – Classificação da lesão observada no tecido cerebral dos camundongos infectados com os diferentes vírus, de acordo com o grau de comprometimento.

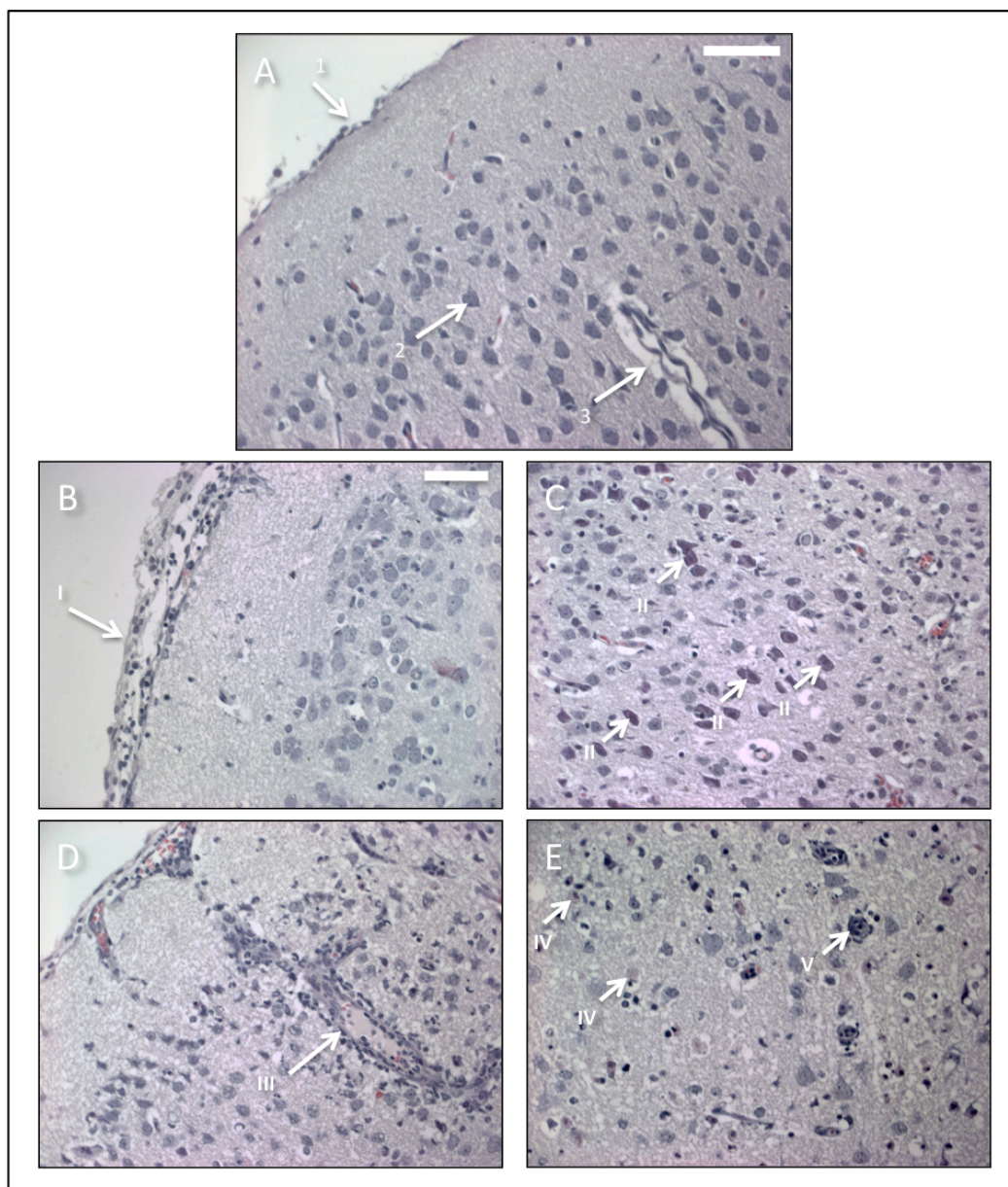
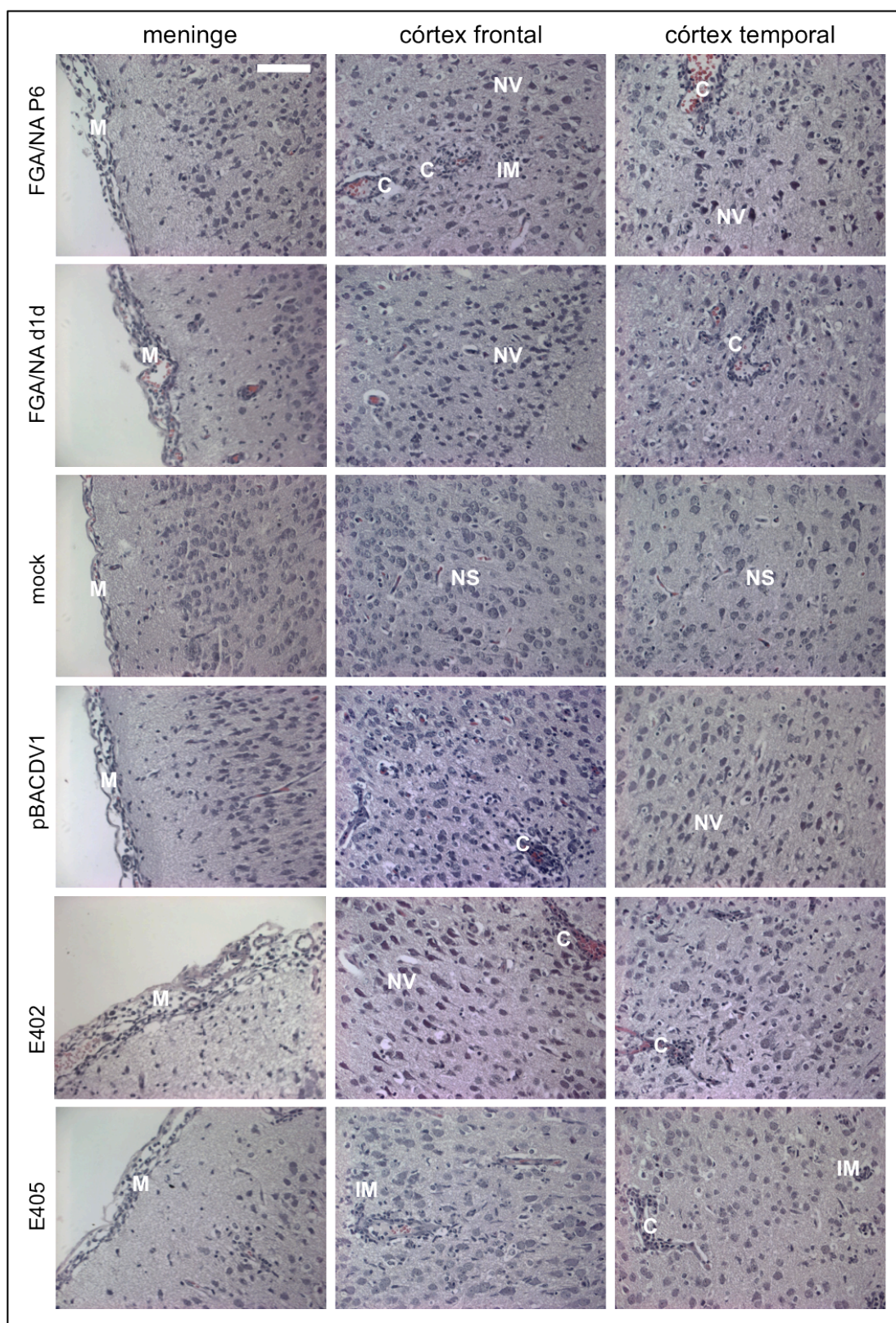


Figura 4.42 – Histopatologia do córtex fronto-parietal do SNC de camundongos, destacando os critérios que caracterizam o quadro de encefalite, lâminas coradas com hematoxilina-eosina. **A** – Secção do cérebro do camundongo inoculado com *mock*, (1) meninge, (2) neurônios saudáveis, (3) vaso sanguíneo saudável. **B a E** – Secções de cérebros de camundongos infectados com vírus dengue recombinantes, (I) meningite moderada, (II) necrose neuronal (neurônio vermelho), (III) cerebrite (infiltrado mononuclear ao redor de vasos), (IV) nódulo microglial, (V) hiperplasia microglial. Aumento de 400x e barras equivalentes a 50µm.

Além dos vírus FGA/NA-P6 e FGA/NA-d1d, anteriormente caracterizados e sabidamente neuropatogênicos, as secções do cérebro dos camundongos infectados com os vírus NS3-435, NS3-480, E402/NS3-480 e E405/NS3-435 apresentaram um grande comprometimento do SNC, atingindo principalmente neurônios motores e de equilíbrio, localizados nos córtices frontal e temporal. Estes

dados coincidem com o período de aparecimento de doença nos animais infectados com os mesmos vírus (ver item 4.7).



continua na próxima página...

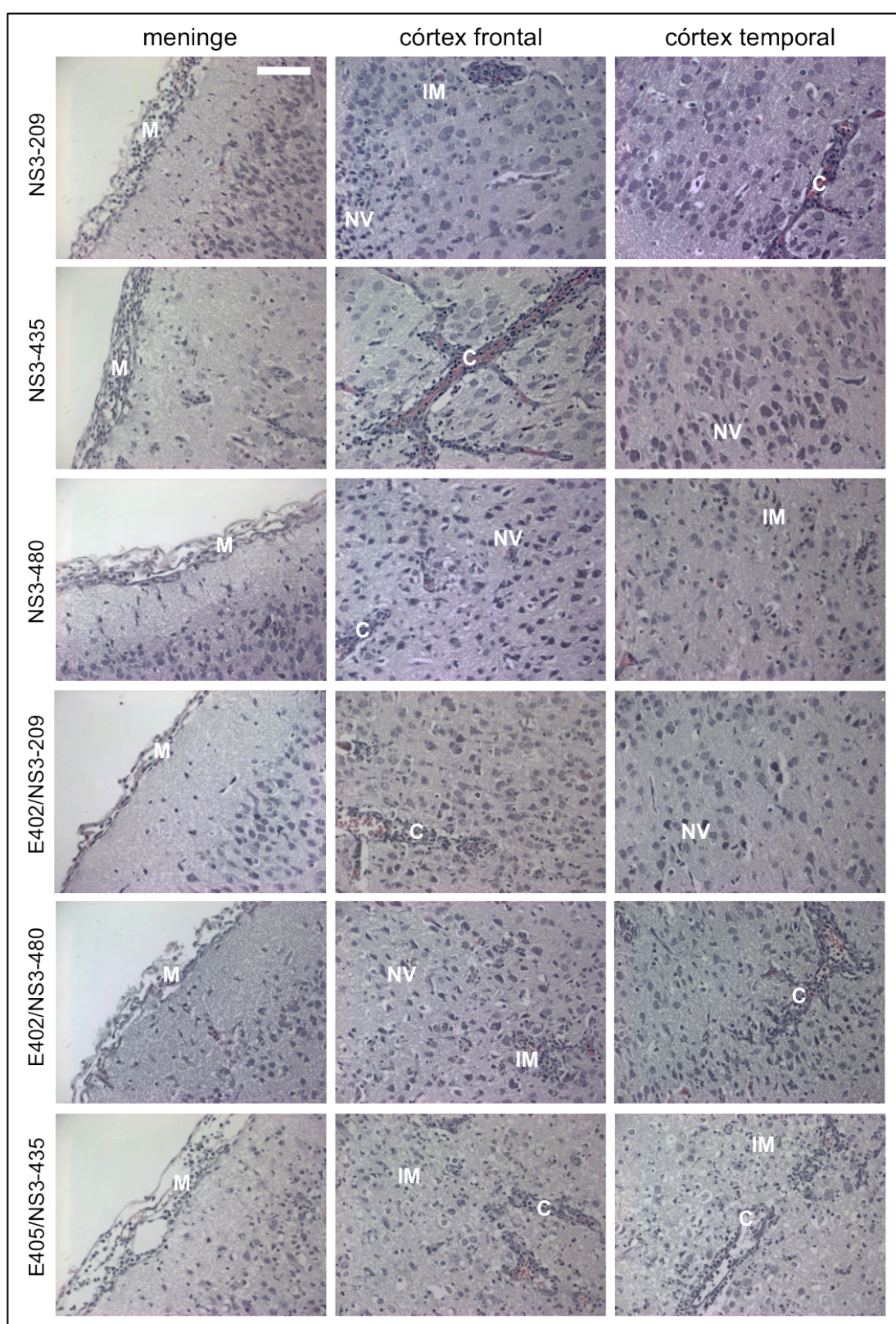
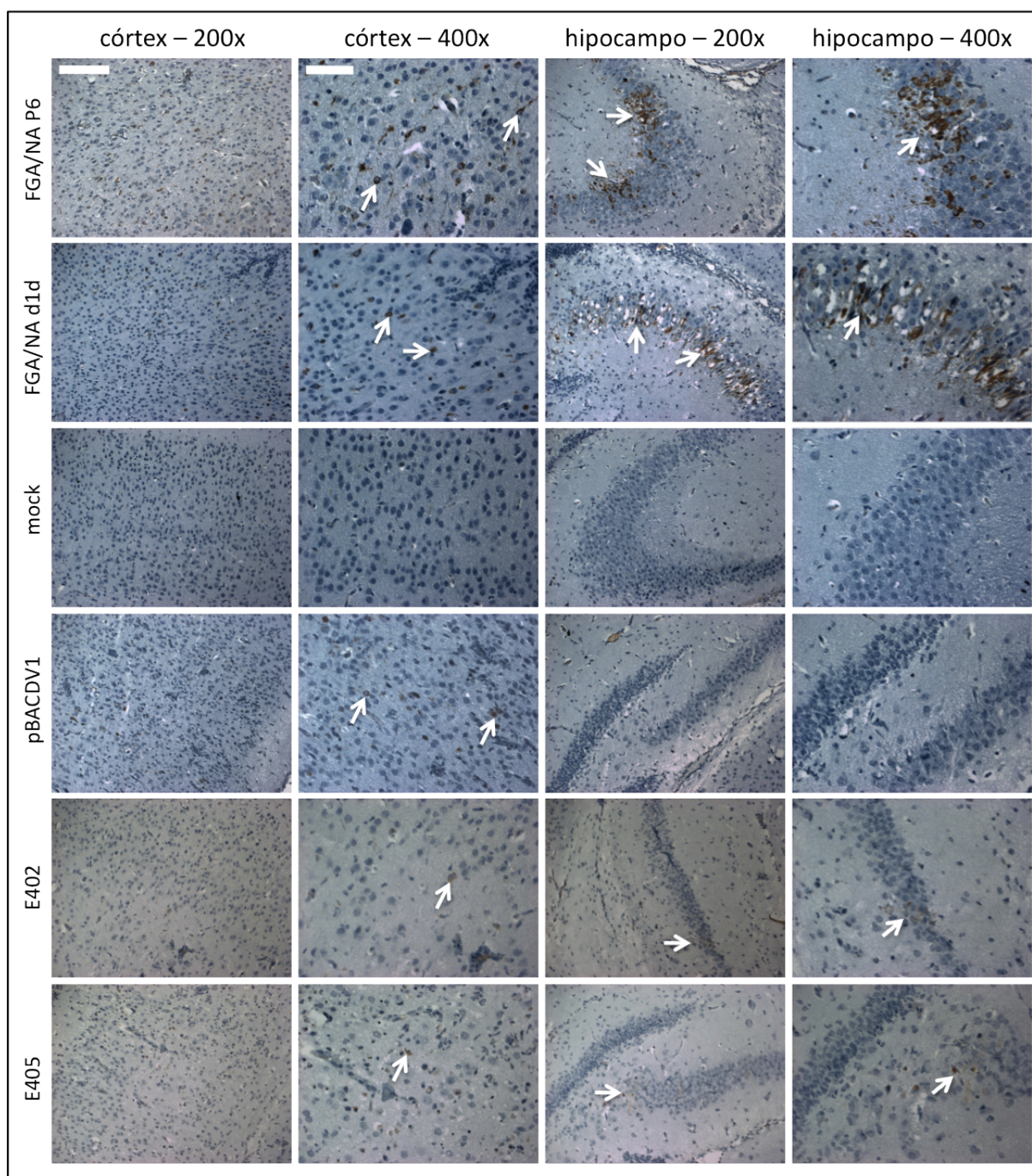


Figura 4.43 – Histopatologia do SNC de camundongos inoculados com vírus recombinantes, áreas da meninge, córtex frontal e córtex temporal. **(M)** meninge, **(IM)** infiltrado mononuclear, **(C)** cerebrite, **(NV)** neurônio vermelho, **(NS)** neurônio sadio. Aumentos de 400x, barra equivalente a 70µm.



continua na próxima página...

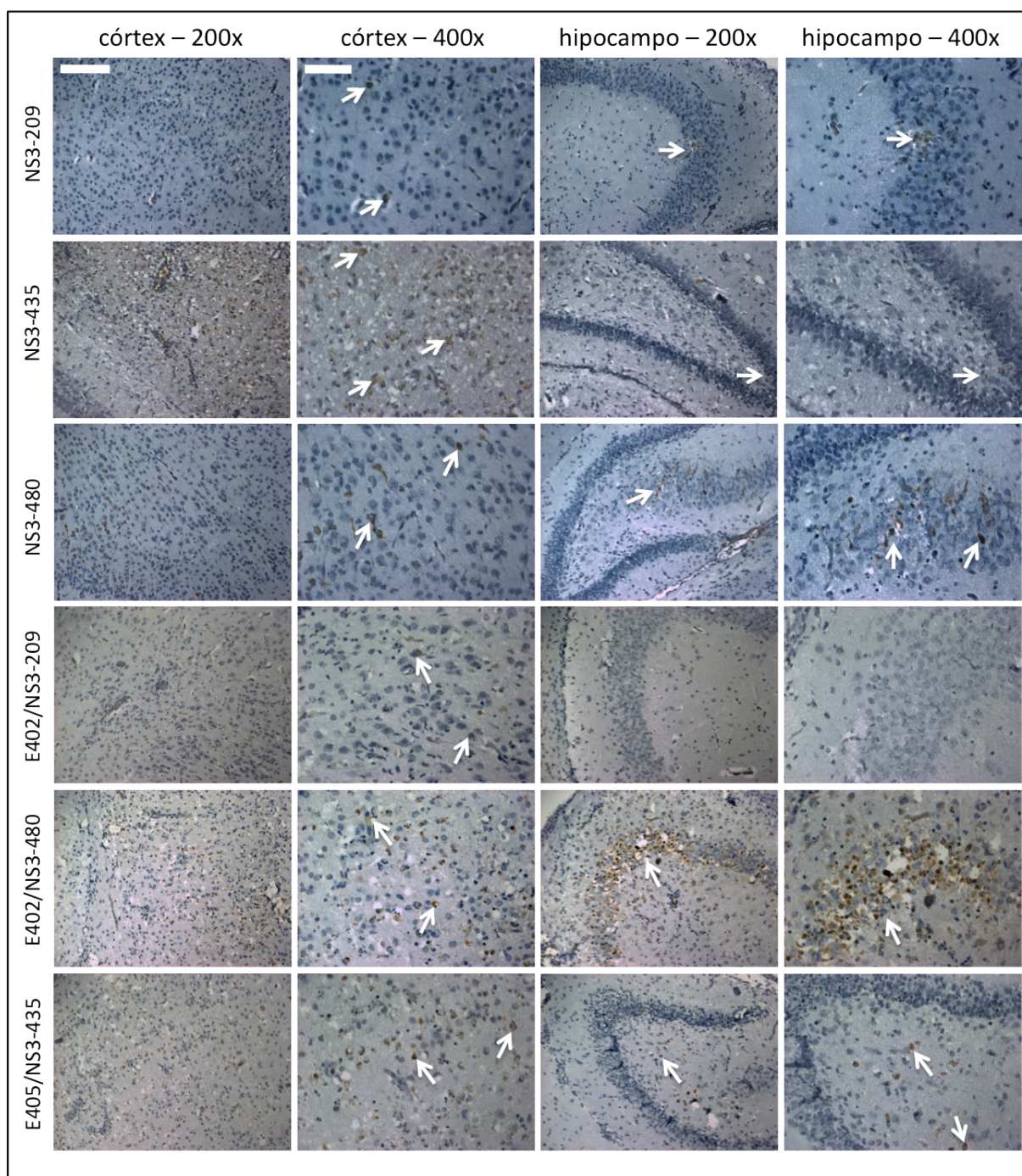

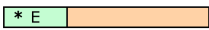

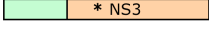






Figura 4.44 – Análises por imunohistologia do SNC de camundongos inoculados com vírus recombinantes. As flechas apontam algumas células marcadas. Aumentos de 200x, barra equivalente a 150µm. Aumentos de 400x, barra equivalentes a 70µm.

CLONE	CONSTRUÇÃO	ESTUTURA VIRAL	EFEITO CITOPÁTICO	MORTALIDADE (%)	ENCEFALITE	TAXA REPLICAÇÃO VIRAL	MODULAÇÃO EXPRESSÃO GÊNICA
pBACDV1		BR/90	fusão	0	discreta	baixa	-
E402		BR/90	fusão	0	moderada	média	baixa
E405		BR/90	não fusão	0	moderada	média	baixa
NS3-209		BR/90	fusão	0	discreta	média	baixa
NS3-435		BR/90	fusão	27	moderada	média	baixa/média
NS3-480		BR/90	fusão	51	acentuada	média	baixa
E405/NS3-435		BR/90	não fusão	70	moderada	alta	alta
E402/NS3-209		BR/90	fusão	0	discreta	baixa	baixa
E402/NS3-480		BR/90	fusão	100	acentuada	alta	alta
FGA/NA-d1d		FGA/89	não fusão	96	moderada/acentuada	média	alta
FGA/NA-P6		FGA/89	não fusão	100	moderada/acentuada	média	alta

Quadro 4.3 – Compilação resumida dos resultados obtidos com os clones construídos neste trabalho, com o respectivo esquema da localização de cada mutação.

4.12 Construção de novos clones contendo aminoácidos de diferentes famílias na posição NS3-480

Observando os resultados obtidos, é possível inferir que a mutação NS3-480 possui um papel importante no processo de neurovirulência em cepas virais neuroadaptadas. Sendo assim, na tentativa de definir a importância da característica do aminoácido no processo de neurovirulência, foram gerados 10 novos clones substituindo a mutação NS3-480 por outros aminoácidos com diferentes características de carga e índices de hidrofobicidade (Tabela 3.12 – item 3.5).

O DNA do clone infeccioso pBACDV1 serviu como molde para a síntese dos fragmentos contendo as mutações, pela amplificação por PCR de fusão, seguindo mesmo protocolo já descrito para os demais clones (ver item 4.2).

As Figuras 4.45 e 4.46 mostram o perfil eletroforético das amplificações, referentes a cada mutação, sendo o tamanho de cada fragmento correspondente ao esperado.

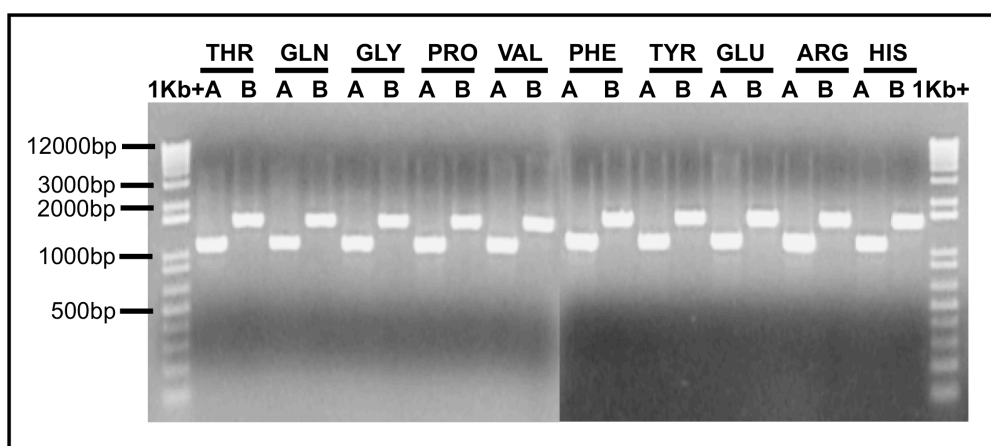


Figura 4.45 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amplificações dos novos fragmentos mutados NS3-480. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen), **A** – fragm A, **B** – fragm B, para cada estratégia de mutação.

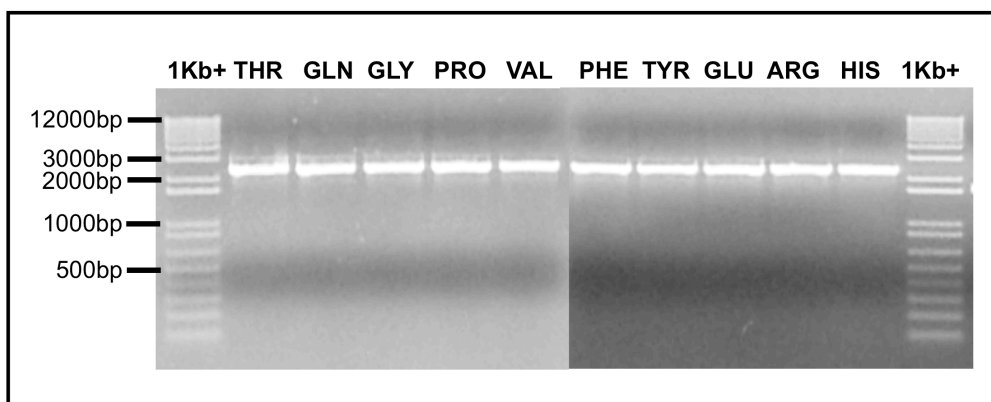


Figura 4.46 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amplificações por PCR de fusão dos novos fragmentos mutados NS3-480. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

Os novos fragmentos NS3-480 fusionados foram purificados e digeridos com as endonucleases de restrição BsiWI e NheI. O fragmento de interesse de 1.604pb foi purificado por excisão de gel de agarose (Figura 4.47). O clone pBACDV1 previamente digerido com as mesmas enzimas (Figura 4.5 – item 4.2) foi utilizado como vetor.

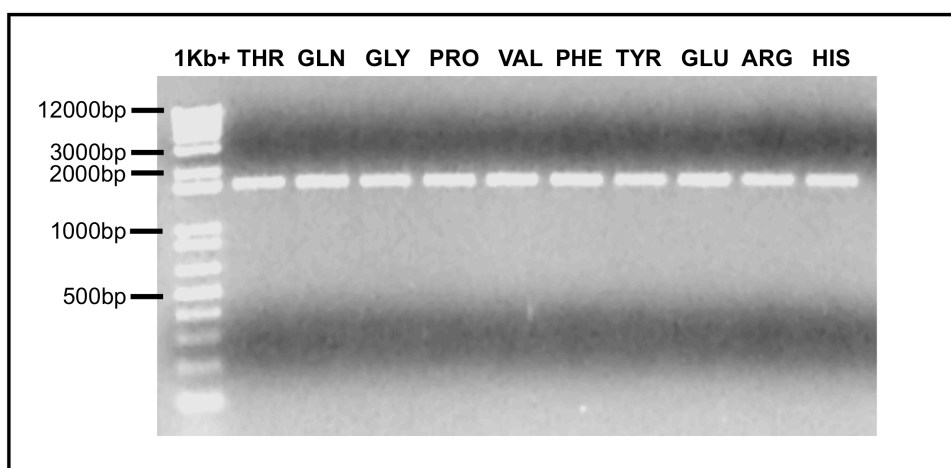


Figura 4.47 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% das digestões BsiWI/NheI dos fragmentos contendo as novas mutações NS3-480. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

Cada fragmento de DNA foi utilizado para clonagem no clone pBACDV1 pela substituição da região correspondente, seguindo protocolo da enzima T4 DNA ligase. As ligações foram utilizadas para transformar bactérias TOP10 cálcio-competentes. As colônias resultantes foram transferidas para uma nova placa numerada para identificação dos possíveis clones. Algumas colônias de cada clone foram submetidas à triagem através da técnica de PCR de colônia (dado não mostrado) e posterior digestão com a endonuclease de restrição BsaBI para confirmação de prováveis clones (Figura 4.48).

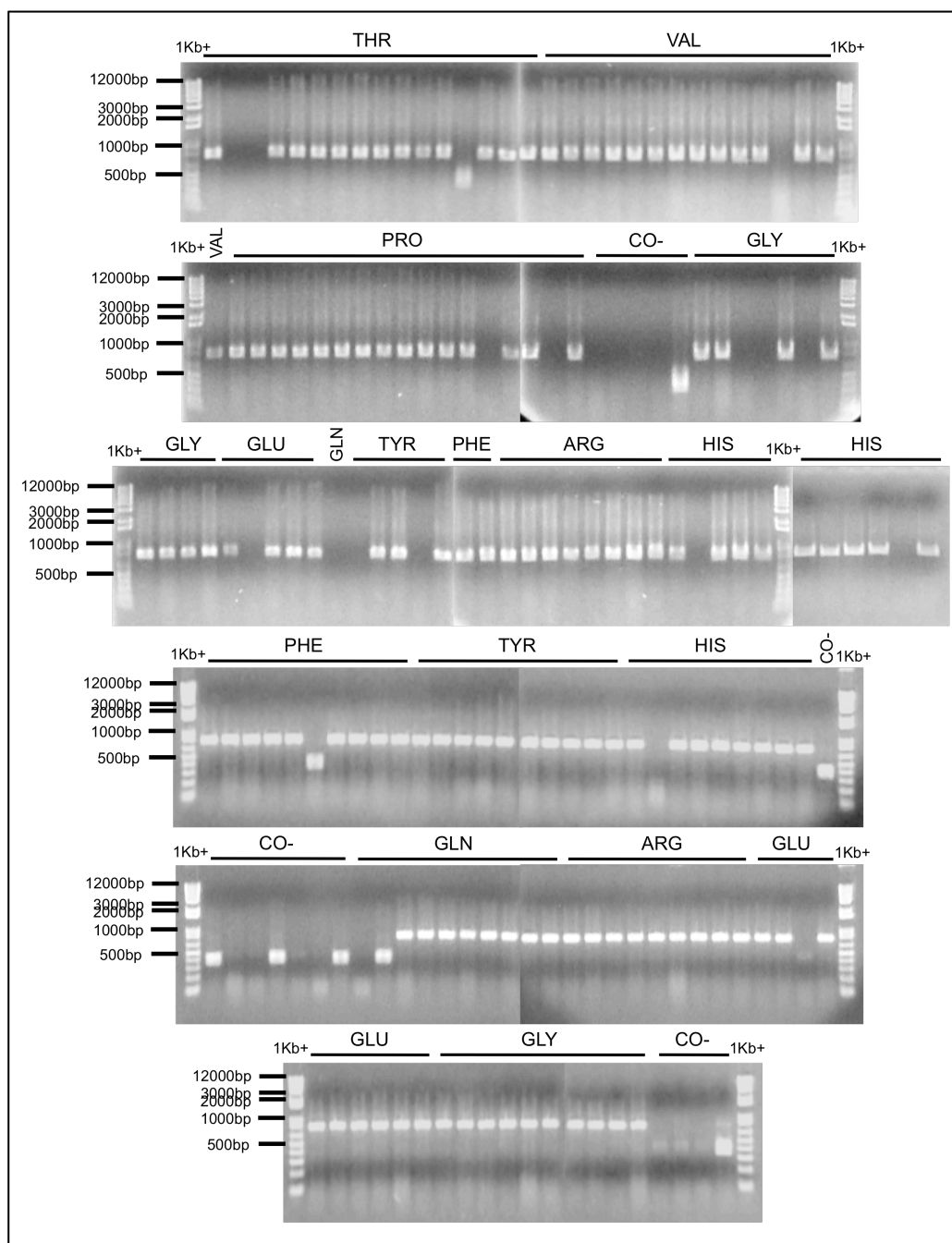


Figura 4.48 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da digestão confirmatória dos PCRs de colônia dos novos clones NS3-480 com endonuclease de restrição BsaBI. **1Kb+** – marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen), **CO-** – controle negativo (digestão das amplificações de colônias crescidas da clonagem do vetor sem inserto).

Aproximadamente 79% das colônias testadas foram confirmadas por digestão. A partir disso, foram escolhidas algumas colônias dos clones Thr, Val, Glu e Arg para confirmação por sequenciamento e continuidade do trabalho. As colônias foram amplificadas e sequenciadas com a mesma estratégia já utilizada para o clone NS3-480 (item 4.2 – dado não mostrado). A escolha dos aminoácidos foi baseada nas características de cada um (ver Tabela 3.12 – item 3.5). Para tanto, foram

escolhidos dois aminoácidos semelhantes ao já estudados, como a treonina (Thr) que é polar e nucleofílico, semelhante a serina do vírus neuroadaptado FG/NA-P6, e a valina (Val) que é apolar e hidrofóbico, como a leucina no vírus pBACDV1. Os outros aminoácidos foram escolhidos por possuírem característica bem diferentes, como o ácido glutâmico (Glu), por ser ácido e carregado negativamente, e arginina (Arg), por ser básico e carregado positivamente. A Figura 4.49 mostra as estruturas químicas destas moléculas.

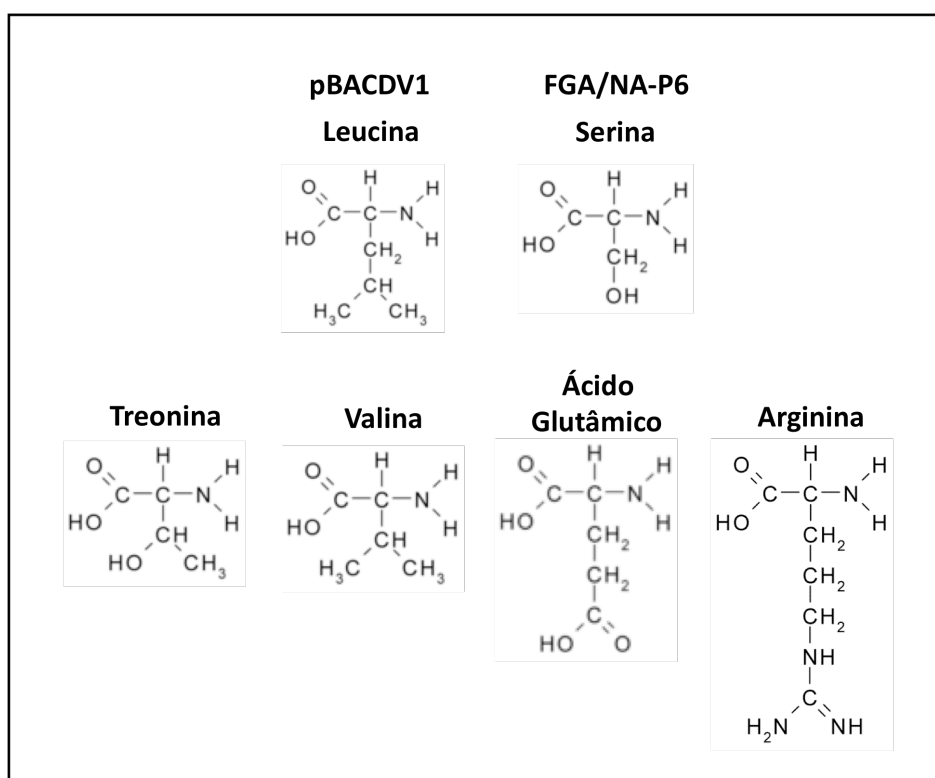


Figura 4.49 – Estrutura química dos aminoácidos escolhidos para clonagem na posição NS3-480.

Após o sequenciamento, não foi identificado nenhum clone Thr contendo a sequência correta, sem mutações extras. Os clones das outras mutações que continham sua sequência correta, foram identificados como: 480Val_cl.9, 480Glu_cl.40 e 480Arg_cl.75. As *minipreps* de DNA destes clones (Figura 4.50A) foram linearizadas pela digestão com a enzima de restrição SwaI, de acordo com os tampões e condições descritas pelo fabricante. Em seguida, as reações eram purificadas pela extração com fenol e precipitação com etanol (Figura 4.50B). As amostras de DNA clivadas foram utilizadas como molde para reações de síntese de RNA, utilizando o kit de transcrição *in vitro* T7 MEGAscript, com adição de *cap*.

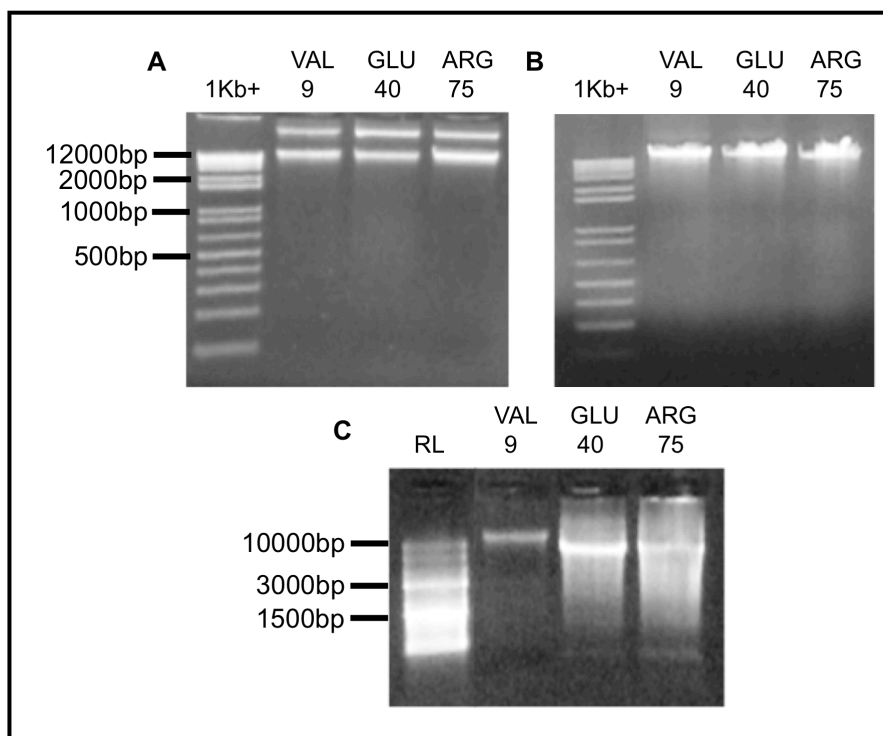


Figura 4.50 – Eletroforeses em gel de agarose 0.8% dos novos clones NS3-480. **A** – *Minipreps*. **B** – Digestões SawI. **C** – RNAs resultantes das transcrições *in vitro*.

Os RNAs recombinantes transcritos (Figura 4.50C) foram utilizados para transfecção em células de inseto C6/36 utilizando protocolo com lipofectina, como já descrito anteriormente (ver item 4.3.3). Os sobrenadantes foram recolhidos com 120 horas pós transfecção, aliquotados e armazenados a -70°C para sua posterior titulação.

Foram obtidos os títulos $2.5 \times 10^2 \text{ffu/mL}$ para Val_cl.9, $3.7 \times 10^6 \text{ffu/mL}$ para Glu_cl.40 e $3.25 \times 10^6 \text{ffu/mL}$ para Arg_cl.75. Estes vírus recombinantes estão sendo amplificados em culturas de células C6/36 (como descrito no item 4.3.4) para purificação em gradiente de sacarose, inoculação em camundongos Swiss e análise de fenótipo *in vivo*.

5. DISCUSSÃO

Apesar dos recentes avanços no conhecimento da biologia do vírus da dengue, resultado de estudos das proteínas virais e dos mecanismos de replicação e tradução, a patogênese relacionada à infecção por DENV continua sendo um desafio, principalmente pela falta de um modelo animal que desenvolva a doença de forma similar ao homem (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Sabe-se que a infecção por qualquer um dos quatro sorotipos da dengue pode causar desde quadros assintomáticos até quadros graves da doença, com eventos hemorrágicos, podendo resultar em óbito. Porém, os achados clínicos da doença têm se modificado nos últimos anos, e o aparecimento de episódios de encefalite associados à infecção com o vírus da dengue vêm aumentando significativamente (SUMARMO *et al.*, 1978; LUM *et al.*, 1996; HOMMEL *et al.*, 1998; RAMOS *et al.*, 1998; SOLOMON *et al.*, 2000; CAM *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2002; MALAVIGE *et al.*, 2004; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2006; DOMINGUES *et al.*, 2007). Alguns dos possíveis mecanismos sugeridos para explicar a patogênese neurológica na infecção pelo DENV seriam, a invasão direta do SNC pelo vírus, a ocorrência de danos sistêmicos indiretos, reações autoimunes secundárias à infecção sistêmica, ou ainda, ocorrência de episódios de trombocitopenia seguidos de hemorragia cerebromeningeal (RAMOS *et al.*, 1998; PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2009). Acredita-se que os flavivírus atravessem a barreira hematoencefálica por transporte passivo através do endotélio, pela replicação ativa nas células endoteliais, ou pelo mecanismo de “Cavalo de Tróia”, pelo qual os vírus são carregados para dentro do cérebro por células inflamatórias infectadas, e assim infectem células do SNC. Porém, o mecanismo específico pelo qual os vírus da dengue atravessam essa barreira ainda não está totalmente compreendido, e qualquer que seja o mecanismo envolvido no rompimento da barreira hematoencefálica, representa um evento-chave na patogênese da encefalite causada por flavivírus (DIAMOND, 2003; MISHRA *et al.*, 2009).

Uma abordagem para melhor entender a neuropatologia da dengue, seria determinar quais sequências ou estruturas virais estariam envolvidas na virulência, comparando o genoma viral completo, amplificado diretamente de amostras biológicas de pacientes com diferentes quadros clínicos da doença, incluindo os

neurológicos. Inúmeros trabalhos têm sido realizados nos últimos anos no sentido de identificar alterações genéticas que possam estar relacionadas ao aumento da gravidade dos casos de dengue. A primeira evidência da presença de determinantes genéticos associados à maior gravidade nos casos de dengue foi identificada em estudos com cepas de DENV2, indicando que o genótipo asiático está mais associado à doença grave em relação ao genótipo americano (RICO-HESSE *et al.*, 1997). Leitmeyer *et al.* (1999) estudaram o genoma completo de 11 amostras de DENV2, associados à DF ou DHF. Foram observadas seis diferenças na sequência de aminoácidos dos genes que codificam as proteínas prM, E, NS4B e NS5, porém não havia associação direta destas mutações com a gravidade da doença. Um possível determinante de virulência foi identificado na posição 390 da proteína de envelope, já que alterações nesta posição, que está envolvida com a ligação a receptores na célula hospedeira (CHEN; MAGUIRE; MARKS, 1996), endocitose mediada por receptor, tropismo celular e estímulo à produção de anticorpos neutralizantes (CHAO *et al.*, 2005), aumentam a neurovirulência do DENV2 em camundongos recém-nascidos (SÁNCHEZ; RUIZ, 1996). Muitos trabalhos têm comparado as sequências de isolados de DENV obtidos de pacientes que apresentaram doença grave (DHF/DSS) com outros isolados de casos de DF. A maioria identifica variações genéticas entre os isolados, mas não diferenças consistentes na sequência, que sejam marcadores moleculares de gravidade de doença (MANGADA; IGARASHI, 1998; PANDEY; IGARASHI, 2000; UZCATEGUI *et al.*, 2001; AQUINO *et al.*, 2006).

Inúmeros trabalhos descrevendo casos de pacientes com manifestações neurológicas relacionadas à infecção por DENV têm sido relatados, mas até o momento não foi realizada a caracterização genética completa do DENV a partir deste material e, portanto nenhum marcador molecular de neurovirulência foi determinado. A abordagem normalmente utilizada é a identificação de anticorpos contra dengue no soro e fluído cerebrospinal desses pacientes, ou ainda o protocolo de isolamento viral para determinação do sorotipo infectante (PATEY *et al.*, 1993; ROW; WEINSTEIN; MURRAY-SMITH, 1996; SOLOMON *et al.*, 2000; KANKIRAWATANA *et al.*, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2005; GARCIA-RIVERA; VORNDAM; RIGAU-PÉREZ, 2009).

Na ausência de determinantes genéticos caracterizados que estejam relacionados à neuropatologia da dengue em humanos e visando compreender

melhor a patogênese dessa doença, Desprès *et al.* (1998) e Bordignon *et al.* (2007), utilizando um modelo murino, geraram variantes de DENV1 altamente neurovirulentas, FGA/NA-d1d, FGA/NA-a5c e FGA/NA-P6, que se replicam eficientemente no SNC de camundongos. Os determinantes genéticos potencialmente responsáveis pelo fenótipo neurovirulento dessas variantes foram identificados pelo sequenciamento completo do genoma das cepas virais e mapeiam nas proteínas E e NS3 do vírus da dengue (Quadro 1.1) (DUARTE DOS SANTOS *et al.*, 2000; BORDIGNON *et al.*, 2007).

Para confirmar o envolvimento das mutações identificadas por Duarte dos Santos *et al.*, 2000 e Bordignon *et al.*, 2007 durante o processo de neuroadaptação, e tentando compreender os mecanismos implicados no desenvolvimento de doença neurológica nos animais, foram gerados, nesse trabalho, clones infecciosos recombinantes contendo cada uma das mutações identificadas nas cepas neuroadaptadas isoladamente ou em conjunto. Os clones foram construídos pela inserção das mutações no clone infeccioso pBACDV1, construído a partir da cepa DENV1 BR/90 (SUZUKI *et al.*, 2007). Os vírus recombinantes gerados foram avaliados quanto ao seu potencial de replicação em células de inseto, infectividade no SNC de camundongos *Swiss* neonatos, indução de resposta imune no SNC dos animais e perfil histopatológico do tecido cerebral considerando as lesões ocasionadas pela infecção.

As cepas FGA/89 (cepa parental utilizada no estudo de neuroadaptação) e BR/90 (utilizada na construção do clone infeccioso pBACDV1) possuem uma diferença de 21 resíduos de aminoácidos na totalidade da poliproteína. A inserção de mutações pontuais de uma cepa viral no contexto do genoma de outra cepa distinta torna os resultados mais robustos, tendo em vista que, os resultados observados reproduziram o fenótipo das cepas neuroadaptadas, o que reforça o envolvimento destas mutações na neuropatogênese da dengue.

O clone infeccioso pBACDV1, utilizado para a construção dos vírus recombinantes deste estudo, foi construído no BAC, um vetor de cópia única, visando contornar o problema da instabilidade da clonagem desses genomas nos sistemas bacterianos (YUN *et al.*, 2003; PIERRO *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2007). O clone compreende a sequência completa do genoma da cepa BR/90 e possui algumas características que visam o maior rendimento do RNA sintético no protocolo de transcrição *in vitro*, como a sequência promotora T7 RNA polimerase, adicionada

de uma base G, imediatamente antes da região 5'NTR. A presença do nucleotídeo extra parece estar associada a uma maior taxa de transcrição do que o A que constitui o primeiro nucleotídeo dos genomas de flavivírus (RICE *et al.*, 1989; IMBURGIO *et al.*, 2000); e a sequência da ribozima do vírus da hepatite delta, que parece aumentar a eficiência de transfecção de 20 a 100 vezes quando comparada à estratégia tradicional de linearização com endonuclease, seguida de tratamento com exonuclease (ROSSI *et al.*, 2005).

As mutações testadas nesse estudo foram identificadas no genoma viral das variantes neuroadaptadas, FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6, sendo as mutações E402 (Phe₄₀₂Leu) e E405 (Thr₄₀₅Ile), mapeadas na haste da proteína E, e as mutações NS3-209 (Val₂₀₉Ile), NS3-435 (Leu₄₃₅Ser) e NS3-480 (Leu₄₈₀Ser), no domínio helicase da proteína NS3, sugerindo a participação dessas duas proteínas no desenvolvimento do fenótipo de neurovirulência em camundongos. As demais mutações que foram identificadas apenas na cepa FGA/NA-d1d (E196 e E365) foram desconsideradas (BORDIGNON *et al.*, 2007).

Outros trabalhos utilizando clones infecciosos do vírus da dengue, relacionando neurovirulência em camundongos com a presença de mutações, geralmente mapeiam na proteína E. Kawano *et al.* (1993) analisaram genomas infecciosos quiméricos construídos pela clonagem da região estrutural de diferentes cepas de DENV4 no esqueleto de uma variante não neurovirulenta. Os autores identificaram um clone altamente neurovirulento, que continha as proteínas estruturais de uma cepa sabidamente neurovirulenta de DENV4, indicando que essa região estaria associada ao fenótipo. Nesse trabalho foram identificadas 2 mutações localizadas na proteína E, Thr₁₅₅Ile, que elimina um dos dois sítio de glicosilação de E e Phe₄₀₁Leu, ambas possivelmente relacionadas aos resultados observados nos camundongos. Chen *et al.* (1995) estudaram, em um clone quimérico DENV3/DENV4, o efeito de duas substituições na proteína E (Glu₄₀₆Lys e Thr₄₃₅Leu), identificadas em DENV2 e DENV4, respectivamente, e que conferem neurovirulência em camundongos. Experimentos de inoculação i.c. em camundongos revelaram que a quimera mutante contendo a substituição Glu₄₀₆Lys, que mapeia no mesmo domínio das cepas neurovirulentas deste estudo, apresentava caráter neurovirulento, enquanto o vírus parental, não. Gualano *et al.* (1998) construíram um clone infeccioso da cepa Nova Guiné C de DENV2 (MON501), altamente virulenta, e substituíram as proteína prM/E pelas de uma cepa

não neurovirulenta, também do sorotipo 2 (MON310). Os autores identificaram sete mutações na região prM/E, sendo uma delas não-conservativa, no resíduo 126 da proteína E (Glu₁₂₆Lys). Foram inseridas substituições Glu₁₂₆Lys e Lys₁₂₆Glu nos clones MON310 e MON501, respectivamente. As propriedades destes mutantes demonstraram claramente que o resíduo Lys na posição 126 era o determinante da neurovirulência em camundongos. Outro grupo identificou essa mesma substituição Glu₁₂₆Lys, que representa a mudança de um aminoácido negativamente carregado por um positivamente carregado, como provável responsável por desempenhar um papel importante na aquisição do fenótipo de neurovirulência em camundongos (BRAY *et al.*, 1998). Zhao *et al.* (2003) geraram duas variantes do clone MON501, de DENV2, contendo as substituições Lys₆₂Glu e Asn₂₀₃Asp. Os vírus gerados a partir desses clones foram utilizados para inocular camundongos neonatos via i.c. Quando comparados com os animais inoculados com o vírus MON501, foi possível observar que um número menor de animais apresentou sinais de encefalite e o tempo de sobrevivência foi maior. Desse modo, os autores concluem que as posições E62 e E203 estão diretamente ligadas ao desenvolvimento do fenótipo de neurovirulência em camundongos. Lee e Lobigs (2000) construíram um clone infeccioso de Encefalite de *Murray Valley* (MVE) e investigaram o impacto da mudança de aminoácido na posição Asp₃₉₀ no tropismo celular, entrada do vírus e virulência. Três vírus mutantes, Asp₃₉₀Gly, Asp₃₉₀Ala e Asp₃₉₀His, demonstraram diferenças em relação ao clone controle quando crescidos em células de mamífero e de mosquito. Neste estudo, foram observadas alterações no tropismo celular relacionadas à entrada do vírus na célula, aumento da dependência de glicosaminoglicanos para a ligação dos vírus a células de mamíferos e diminuição da virulência em camundongos. Estes resultados confirmam o papel funcional desta região da proteína de Envelope na entrada do vírus e sugere que a entrada de Flavivírus encefalíticos possa ocorrer via ligação a glicosaminoglicanos.

Muitos outros autores vêm demonstrando que mutações na proteína E do vírus da dengue e outros *Flavivírus* podem modular a infectividade e virulência desses vírus (HOLZMANN *et al.*, 1990; HASEGAWA *et al.*, 1992; SÁNCHEZ; RUIZ, 1996; RYMAN *et al.*, 1997; LEITMEYER *et al.*, 1999; MONATH *et al.*, 2002; GUIRAKHOO *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; BORDIGNON *et al.*, 2007; NICKELLS *et al.*, 2008; PRESTWOOD *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2008; KROSCHEWSKI; SAGRIPANTI; DAVIDSON, 2009; TAJIMA *et al.*, 2010). Dados

desses estudos indicam que normalmente estas mutações estão localizadas em três regiões diferentes: na base do domínio II (resíduos 52-136 e 190-284), região que atua como dobradiça durante a mudança conformacional fusogênica da proteína; na região de contato entre a interface dos domínios I e III, que constitui o sítio de dimerização ou trimerização dos monômeros da proteína E após o contato do vírus com a membrana celular; ou ainda, na face distal do domínio III (resíduos 303-395), que possui uma conformação tipo-IgG. Mutações nessa última, modificam a capacidade do vírus se ligar à célula hospedeira, afetando a internalização viral ou o tropismo celular (REY *et al.*, 1995; SÁNCHEZ; RUIZ, 1996).

As mutações estudadas no presente trabalho, identificadas na proteína E (Phe₄₀₂Leu e Thr₄₀₅Ile), estão localizadas na haste, em uma estrutura α -hélice denominada H1^{pred}, logo abaixo do domínio III, na porção C-terminal da proteína (Figuras 1.7 e 4.1) (ALLISON *et al.*, 1999). Todas as estruturas atômicas da proteína E determinadas para os *Flavivirus* foram obtidas apenas para o ectodomínio da proteína (domínios I, II e III), excluindo-se as regiões da haste e âncora transmembrana, para as quais somente estruturas preditas, baseadas em sequências nucleotídicas, estão disponíveis.

Muitos grupos vêm investigando o papel da haste da proteína E na formação de homotrímeros, na interação com a proteína prM, formação de partículas e retenção intracelular, utilizando clones quiméricos (ALLISON *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2003; PURDY; CHANG, 2005; HSIEH *et al.*, 2008). Allison *et al.* (1999) construíram uma série de clones truncados na região C-terminal e tentaram determinar regiões específicas que seriam importantes na interação da proteína E com prM, na formação de partículas virais e nas mudanças estruturais induzidas pelo pH reduzido do meio. Os autores sugerem que o elemento H1^{pred} participa na formação da estrutura trimérica durante o processo de fusão de membranas. Clones truncados desta sequência eram secretados na forma de dímeros que se dissociavam em pH baixo, mas não chegavam a formar trímeros, enquanto clones que possuíam deleções imediatamente após o elemento H1^{pred}, foram capazes de converter irreversivelmente a proteína E na forma de trímeros. Purdy e Chang (2005) inseriram diversas mutações em um clone quimérico (prM/E), nas regiões H1 e H2 da haste de E, e identificaram três substituições de aminoácidos na α -hélice H1 (Ile₃₉₈Leu, Met₄₀₁Ala e Met₄₁₂Leu) que aumentariam a secreção de VLPs. Além disso, observaram que construções duplas ou triplas contendo essas mutações

estão associadas a um aumento na secreção de VLPs, quando comparadas com os clones contendo apenas uma mutação. Em um outro estudo, com o vírus Langat (LGTV), flavivírus transmitido por carrapatos, os autores compararam a patogenicidade em camundongos da cepa parental TP21 com quatro cepas variantes, que foram isoladas e caracterizadas como não ligantes à receptores de membrana. Foram identificadas mutações na região da haste da proteína E das cepas variantes (Leu₄₁₆Ala, Asn₄₇₃Lys, Val₄₄₀Ala, His₄₃₈Tyr) e ensaios de DL₅₀ em camundongos demonstraram que todas as cepas variantes eram atenuadas (HOLBROOK *et al.*, 2001). Estudos com TBEV e WNV demonstraram o envolvimento da região da haste na interação prM/E e a contribuição dessa interação heterodimérica, assim como da N-glicosilação do resíduo 154 de WNV, na produção de VLPs (ALLISON *et al.*, 1999; HANNA *et al.*, 2005). Hsieh *et al.* (2008) geraram uma série de clones quiméricos prM/E (DENV2/JEV) para investigar os mecanismos envolvidos na produção de VLPs por DENV2 e demonstraram que a haste-âncora da proteína E de DENV2 continha um forte sinal de retenção no retículo endoplasmático (RE), o que poderia contribuir para a produção ineficiente de VLPs. Este dado foi apoiado por relatos recentes de que o domínio transmembrana da proteína E dos vírus YFV e as proteínas E1 e E2 do vírus da hepatite C (HCV) continham um sinal de retenção no RE (COCQUEREL *et al.*, 1998, 1999; OP DE BEECK *et al.*, 2004).

Baseado nos dados descritos na literatura, a presença de mutações na região H1^{pred} do vírus da dengue poderia facilitar o processo de trimerização e consequentemente o processo de fusão de membranas e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma das células, aumentar a secreção de novas partículas virais para o exterior das células, e desta forma, alterar a patogenicidade viral. Sendo assim, a presença dessas mutações poderia estar associada a um processo de fusão de membranas mais eficiente e à liberação de um número maior de nucleocapsídeos no citoplasma, desencadeando a tradução e replicação do genoma viral em maior escala, e consequentemente na produção de mais progênie viral, resultando em um aumento na virulência e patogenicidade da infecção.

A proteína NS3, juntamente com as demais proteínas do CR, desempenha função essencial na replicação do RNA viral (KAPOOR *et al.*, 1995a; MATUSAN; *et al.*, 2001; LUO *et al.*, 2008; BOLLATI *et al.*, 2009). O papel-chave da atividade helicase da NS3 na replicação viral foi demonstrado através de estudos de

mutagênese sítio-dirigida (GRASSMANN *et al.*, 1999; MATUSAN *et al.*, 2001; SAMPATH *et al.*, 2006). O domínio helicase da proteína NS3 parece ser responsável por auxiliar na inicialização da síntese de moléculas de RNA simples fita de polaridade negativa, (-)ssRNA, através do desenovelamento de estruturas secundárias de RNA, permitindo assim o acesso da maquinaria de replicação (TAKEGAMI *et al.*, 1995; MATUSAN *et al.*, 2001). Especula-se que a helicase viabilize a montagem da maquinaria de replicação pelo estabelecimento das estruturas de RNA das regiões 5' e 3'NTR, além de auxiliar na liberação de fitas do genoma viral recém-sintetizadas a partir de intermediários de replicação (WANG *et al.*, 2009). Mutações ao longo da sequência da proteína NS3 demonstraram efeitos sobre a replicação viral e sobre as atividades ATPase e helicase *in vitro* (MATUSAN *et al.*, 2001). Liu, Chen e Khromykh (2003) avaliaram a importância das mudanças de aminoácidos Tyr₅₁₈His e Ser₅₅₇Pro, do domínio helicase da NS3, utilizando um sistema subgenômico de replicon do vírus Kunjin, na replicação viral e/ou na montagem de partículas. Foi observado que a mutação Tyr₅₁₈His era responsável por um decréscimo na infectividade dos RNA transcritos e inibia a replicação viral, enquanto a mudança Ser₅₅₇Pro não apresentava nenhum efeito sobre a replicação. Utilizando um sistema subgenômico de replicon e o clone infeccioso de febre amarela, Patkar e Kuhn (2008), ao estudarem a mutação Trp₃₉₄Ala no domínio helicase da NS3, observaram um bloqueio na produção de partículas virais infecciosas, sugerindo um papel ainda desconhecido dessa proteína nesse processo, uma vez que essa mutação não teve efeito sobre a replicação viral. Apesar dos diversos estudos, relativamente pouco se sabe sobre o mecanismo de atuação das helicases dos *Flavivirus*, como por exemplo sua polaridade de desenovelamento das fitas, a especificidade de substrato de fita dupla, ou ainda a processividade da enzima (WANG *et al.*, 2009).

A mutação NS3-209 (Val₂₀₉Ile), estudada no presente trabalho, está localizada entre os motivos *Walker A* e *Walker B*, do subdomínio 1, na região N-terminal da helicase (Figuras 1.8 e 4.2). Esses motivos estão relacionados com funções de interação com substratos de NTP e ligação a Mg²⁺, respectivamente. Bordignon *et al.* (2007) analisaram o alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio helicase da NS3 abrangendo essa região, e observaram a presença de uma Ile na posição correspondente a 209 da proteína NS3 de DENV1 nos vírus JEV,

WNV e TBEV (XU *et al.*, 2005), todos pertencentes ao grupo de vírus que causam encefalite.

As demais mutações estudadas, NS3-435 (Leu₄₃₅Ser) e NS3-480 (Leu₄₈₀Ser), estão localizadas no subdomínio 2 da helicase, logo após os motivos V e VI, respectivamente (Figuras 1.8 e 4.2). Essa região está envolvida na ligação da proteína ao RNA e hidrólise de ATP e é requerido para a movimentação da helicase ao longo de substratos de ácido nucléico (TUTEJA; TUTEJA, 2004). De acordo com resultados obtidos por Duarte dos Santos *et al.* (2000) a mutação NS3-435 aumenta a habilidade de replicação do vírus *in vitro*. Da mesma forma que para mutação NS3-209, o alinhamento da sequência de aminoácidos do subdomínio 2 identificou um resíduo Ser na posição correspondente a NS3-480 de DENV1 nos vírus JEV e YFV (cepa 17D, neurovirulenta) (XU *et al.*, 2005), sugerindo uma relação entre a presença desse resíduo e o caráter encefalítico da cepa viral. Além disso, um estudo demonstra a interação da helicase de dengue com a proteína NS4b, sugerindo que esta interação module a replicação viral (UMAREDDY *et al.*, 2006).

Baseado nos relatos da literatura e resultados prévios de nossa equipe, podemos inferir que as mutações identificadas na proteína NS3 de DENV1, estariam afetando a atividade da helicase, requerida nas funções replicativas do vírus, aumentando a eficiência da replicação, seja pela função direta desta mutação no genoma ou pela interação da proteína com outras proteínas virais e, conseqüentemente, resultando na síntese de um número maior de moléculas de RNA, o que levaria ao aumento da progênie viral e agravamento da infecção.

Os vírus recombinantes gerados neste trabalho foram inicialmente avaliados quanto à sua habilidade de causar efeito citopático (CPE) em culturas de células de inseto C6/36 (Figura 4.34). Sabe-se que algumas cepas de DENV são capazes de produzir CPE em cultura como por exemplo, fusão celular tipo-sincício, lise ou ainda a inibição do crescimento celular, porém, os mecanismos envolvidos neste processo e os fatores que determinam qual cepa viral desencadeia qual tipo de CPE ainda são desconhecidos. Randolph e Stollar (1990) sugeriram que a formação de fusão tipo-sincício em células de mosquitos infectadas com DENV pode ser iniciada por *virions* recém liberados, que se tornam engajados na fusão com a membrana plasmática de células vizinhas infectadas ou não. As variantes neuroadaptadas, FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6, assim como sua cepa parental, FGA/89, não são capazes de produzir CPE em culturas de C6/36, sendo visualmente indistinguíveis

das culturas infectadas com *mock*. No entanto, o vírus gerado a partir do clone pBACDV1 (cepa BR/90) desencadeia uma intensa fusão celular em culturas (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993). Nas infecções com os vírus recombinantes gerados nesse trabalho, foi possível observar o aparecimento de fusão celular em quase todas as amostras, similar ao pBACDV1, exceto com os vírus contendo as substituições E405 (Thr₄₀₅Ile) e E405/NS3-435 (Thr₄₀₅Ile/Leu₄₃₅Ser), que não apresentaram CPE, semelhante ao vírus FGA/NA-d1d, a partir do qual essas mutações foram inicialmente identificadas. Interessantemente, o vírus contendo apenas a mutação NS3-435 apresenta fusão celular, mas quando combinado com a mutação E405, deixa de apresentar esse efeito, sugerindo que essa mutação desempenhe um papel importante na alteração do fenótipo em cultivo celular. Estudos complementares serão necessários para determinar o potencial papel e importância da mutação E405 no processo de inibição do efeito citopático em culturas de células.

A falta de um modelo animal não-humano que seja susceptível à infecção pelo vírus da dengue impulsiona o desenvolvimento de diferentes linhagens murinas, e embora vários modelos murinos tenham sido relatados, nenhum é capaz de refletir todo espectro da doença (BENTE; RICO-HESSE, 2006; SHRESTA *et al.*, 2006; VASILAKIS; WEAVER, 2008). Alguns estudos sugerem que, embora linhagens de camundongos de laboratório sejam permissivas à infecção e replicação do vírus da dengue, não são observados sinais clínicos evidentes, e cepas selvagens do vírus replicam em níveis muito baixos, praticamente indetectáveis. Para superar esta barreira, são utilizadas doses muito altas de vírus (até 1×10^8 pfu), cepas adaptadas em modelo murino ou ainda inoculação pela via intracraniana (BENTE; RICO-HESSE, 2006). No entanto, dados de um estudo comparativo que avaliou a neurovirulência de vacinas quiméricas (ChimeriVax-JE e ChimeriVax-DEN1) utilizando o modelo de primatas não humanas e um modelo murino (camundongos ICR inoculados por via i.c.), concluiu que o modelo murino era mais sensível para detectar diferenças na virulência das vacinas e que, portanto, poderia eventualmente substituir o teste em primatas não humanos (MONATH *et al.*, 2005).

Na tentativa de avaliar o papel das mutações, optamos por utilizar o modelo experimental desenvolvido por Desprès *et al.* (1998), a fim de comparar *in vivo* os vírus recombinantes gerados nesse trabalho com as variantes neuroadaptadas, previamente descritas (FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6). Esse protocolo consistia na

inoculação por via i.c. de camundongos *Swiss* neonatos com os vírus gerados a partir dos clones recombinantes seguido de 21 dias de observação. A cepa BR/90, que serviu de molde para construção do clone infeccioso pBACDV1, é um isolado clínico do Rio de Janeiro de 1990 (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993), que foi amplificado em laboratório por passagens sucessivas em culturas de células de inseto, nunca tendo sido inoculada em camundongos durante esse processo. Assim, antes de dar início aos experimentos animais, foi realizado um ensaio de DL_{50} para determinar a dose a ser utilizada para inocular os animais, já tendo sido demonstrado previamente que a cepa BR/90 é mais neurovirulenta do que a FGA/89 (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993; DESPRÈS *et al.*, 1996). No ensaio de DL_{50} , foi constatado que, em doses mais elevadas (1×10^4 – 1×10^5 ffu), o vírus era naturalmente neurovirulento, e portanto, estabeleceu-se a dose inicial como sendo de 2 logs abaixo do valor de DL_{50} , como descrito anteriormente por Desprès *et al.*, 1998. Nessa dose, o vírus do clone pBACDV1 não era capaz de causar sinais de encefalite nos animais, enquanto as variantes neuroadaptadas, FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6, inoculadas com a mesma dose, resultavam em morte. Ao analisarmos os animais inoculados com os vírus recombinantes, pudemos observar que os grupos inoculados com os vírus NS3-435 (Leu₄₃₅Ser), NS3-480 (Leu₄₈₀Ser), E405/NS3-435 (Thr₄₀₅Ile/Leu₄₃₅Ser) e E402/NS3-480 (Phe₄₀₂Leu/Leu₄₈₀Ser), desenvolviam sintomas similares aos das cepas neurovirulentas, como sinais de encefalite e paralisia parcial dos membros inferiores, enquanto os grupos de animais inoculados com *mock*, pBACDV1, E402 (Phe₄₀₂Leu), E405 (Thr₄₀₅Ile), NS3-209 (Val₂₀₉Ile) e E402/NS3-209 (Phe₄₀₂Leu/Val₂₀₉Ile) não apresentaram nenhum sinal de doença. Dentre os grupos de animais que desenvolveram doença, foi constatado que 27% dos animais inoculados com NS3-435 (Leu₄₃₅Ser) e 51% dos inoculados com NS3-480 (Leu₄₈₀Ser) sucumbiram à doença (Figura 4.37), sugerindo que estas mutações desempenhem um papel importante no desencadeamento do fenótipo de neurovirulência viral em camundongos. No entanto, para comprovar o papel exato dessas mutações, serão necessários estudos complementares visando confirmar a importância do caráter dos aminoácidos nessas posições. Outro dado interessante foi observado nos grupos de animais inoculados com os vírus E405/NS3-435 (Thr₄₀₅Ile/Leu₄₃₅Ser) e E402/NS3-480 (Phe₄₀₂Leu/Leu₄₈₀Ser), que foram responsáveis pela morte de 70% e 100% dos animais, respectivamente, evidenciando um efeito sinérgico dessas mutações. Esses resultados demonstram

que, mesmo que as mutações E402 (Phe₄₀₂Leu) e E405 (Thr₄₀₅Ile) isoladas não sejam suficientes para causar doença ou morte dos animais, quando combinadas com as mutações da proteína NS3, desempenham um papel importante desencadeando doença neurológica e morte.

Dados da literatura e experiências prévias do nosso grupo apontam a importância da utilização de camundongos neonatos em ensaios de neuropatogênese por dengue, devido ao seu sistema imune ainda não estar completamente maduro (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993; DESPRÈS *et al.*, 1998). Baseado neste dado, experimentos complementares foram realizados com o intuito de observar o possível efeito desses vírus em animais adultos jovens ou ainda, avaliar a rota de inoculação em animais neonatos, utilizando a mesma dose determinada anteriormente. Para tanto, grupos de camundongos Swiss com aproximadamente 6 semanas de vida foram inoculados i.c. com *mock* e com os vírus pBACDV1 e NS3-480 (Leu₄₈₀Ser). Outros três grupos de camundongos Swiss neonatos foram inoculados com as mesmas amostras, porém, por via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram acompanhados por 21 dias e, durante esse período, nenhum dos camundongos, adultos ou neonatos, desenvolveu qualquer sintoma de doença, perda de peso ou mudança comportamental. Esse dado sugere que não houve replicação viral no cérebro nos animais adultos, provavelmente pela ação de seu sistema imune maduro no combate à infecção, e que o vírus não foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica dos animais neonatos. Estudos mais aprofundados serão realizados para confirmar estes achados.

Diferenças na gravidade da infecção por dengue podem ser observadas entre indivíduos ou ainda entre populações (COFFEY *et al.*, 2009). Sendo a dengue uma doença multifatorial, a resposta imune do hospedeiro desempenha um importante papel no desenvolvimento da doença, portanto, a habilidade do vírus escapar desta resposta imune é crucial para o sucesso da infecção. Após a detecção da infecção viral, as células iniciam imediatamente uma resposta antiviral mediada por interferon (IFN) e outras citocinas, na tentativa de prevenir a propagação da infecção (PASIEKA *et al.*, 2006). Bordignon (2008) comparou dados de genômica funcional (microarranjo de DNA) do SNC de camundongos infectados com DENV1 com fenótipos distintos, sendo uma cepa neurovirulenta (FGA/NA-a5c) e outra não-neurovirulenta (FGA/89), demonstrando uma grande indução de mRNA de genes estimulados por interferon (ISG), que possuem atividade antiviral conhecida. Foi

observado que as principais vias moduladas, em função da infecção do SNC dos camundongos com DENV1, estavam envolvidas com a via de sinalização por IFN, processamento e apresentação de antígenos, cascata do complemento e ubiquitinação. Ambas cepas induziam as vias supracitadas, apresentando apenas diferenças na intensidade de modulação dos genes. Estes dados foram confirmados por quantificação, pela técnica de PCR em tempo real, dos genes selecionados como diferencialmente expressos na infecção com a cepa FGA/NA-a5c (neuroadaptada) *versus* a cepa FGA/89 (parental). Baseado nesses achados, no presente trabalho, avaliamos o perfil de expressão de alguns desses genes representantes das principais vias moduladas durante a infecção tais como: IFN- α , IFN- β , Irf1, Psmb8, C1r, Usp18 e Ccl5, comparando a modulação dos genes entre as cepas neurovirulentas, o clone infeccioso pBACDV1 e suas variantes mutantes.

Nos resultados obtidos a partir das análises da expressão gênica nos cérebros dos camundongos infectados com os vírus recombinantes, foi observada uma modulação maior nos grupos de animais inoculados com os vírus duplo-mutantes, E405/NS3-435 (Thr₄₀₅Ile/Leu₄₃₅Ser) e E402/NS3-480 (Phe₄₀₂Leu/Leu₄₈₀Ser), e neuroadaptados (FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6), em relação aos demais vírus para todos os genes analisados (Figura 4.40). Os nossos dados corroboram os resultados de Bordignon (2008), demonstrando que cepas mais neurovirulentas possuem uma modulação gênica maior em relação aos vírus menos patogênicos. Essa resposta imune exacerbada está associada a altas taxas de mortalidade (Figura 4.37) e replicação viral no SNC dos animais inoculados com esses vírus (Figura 4.39).

O processamento de antígenos e sua apresentação à linfócitos T é um processo muito importante na geração da resposta imune adaptativa (GROETTRUP *et al.*, 1996; VAN DEN EYNDE, MOREL, 2001). Tendo em vista os dados que indicam a modulação positiva dos genes da via de apresentação de antígenos, Bordignon *et al.* (2008) sugerem três hipóteses para explicar esses resultados: expressão dessas moléculas em neurônios infectados; células “acessórias”, como a micróglia, oligodendrócitos ou células endoteliais, induzida por citocinas secretadas por neurônios infectados; ou ainda, por células periféricas que infiltram no SNC em processo inflamatório.

Interferon do tipo 1 (IFN- α/β) tem atraído atenção dos pesquisadores nos últimos anos devido ao significativo papel que estas citocinas desempenham no

estabelecimento da proteção contra patógenos (GARCIA-SASTRE; BIRON, 2006). Foi demonstrado que DENV induz uma forte resposta IFN- α/β em infecções naturais (KURANE *et al.*, 1993). Estudos dos níveis de citocinas em amostras de plasma de pacientes infectados com DENV demonstraram padrões característicos de respostas dessas citocinas durante o curso da infecção por DENV, sendo que a liberação de IFN- α ocorre nos primeiros momentos da infecção, parecendo ser crítico para a resposta imune precoce e resistência à infecção por DENV (SHRESTA *et al.*, 2004; NAVARRO-SÁNCHEZ, DESPRÈS, CEDILLO-BARRON, 2005). Johnson e Roehrig (1999) evidenciaram o papel fundamental de IFN- α/β na proteção contra infecções por dengue em experimentos com animais *knockout* para IFN- α/β e receptores de IFN- γ (AG129), que resultou em alta letalidade e consistente viremia no soro e tecidos dos animais. A expressão de IFN- α foi muito baixa para todas as amostras virais ensaiadas neste trabalho (Figura 4.40), muito provavelmente pelo fato de a expressão desse tipo de IFN ocorrer nas primeiras horas de infecção e as amostras analisadas terem sido coletadas com 8dpi. Em contrapartida, os níveis de IFN- β foram mais elevados.

O processo de ubiquitinação clássica tem como objetivo a degradação de proteínas intracelulares, através da marcação destas moléculas para reconhecimento pelo proteassomo. A expressão de ISG15, uma proteína tipo-ubiquitina, e de proteínas de *ISGylation*, uma via funcionalmente semelhante à ubiquitinação clássica, foram identificadas sendo altamente induzidas em infecções virais (KIM; ZHANG, 2003). A proteína Usp18, ou também conhecida como UBP43, foi identificada como sendo uma ISG15 protease “desconjugadora” (MALAKHOV *et al.* 2002). Foi demonstrado que a Usp18 é capaz de se ligar a um receptor celular que interage com a quinase do tipo Janus (JAK1), bloqueando toda a via subsequente de ativação de IFN, reduzindo sua expressão e consequentemente, diminuindo a resistência a infecções virais. Desta maneira, a Usp18 funciona como uma reguladora negativa da via de IFN, sendo importante no controle das respostas mediadas por IFN, auxiliando na manutenção da homeostasia (MALAKHOVA *et al.*, 2006). Assim como o IFN- α , a expressão do gene Usp18 foi baixa (menos de 9 vezes modulado), em comparação com os outros genes.

Todos os demais genes analisados, Irf1, C1r, Psmb8 e Ccl5, tiveram uma modulação intermediária (variando entre 10.5 a 16 vezes modulados), para os vírus

E405/NS3-435 (Thr₄₀₅Ile/Leu₄₃₅Ser) e E402/NS3-480 (Phe₄₀₂Leu/Leu₄₈₀Ser) em comparação com os demais vírus e controles.

O sistema complemento, sendo considerado um pilar da imunidade inata, tem sido reconhecido como um modulador-chave da imunidade adaptativa, atuando diretamente, regulando e modificando as respostas dos linfócitos estimulados (NAVARRO-SÁNCHEZ; DESPRÈS; CEDILLO-BARRON, 2005). O sistema complemento é constituído tanto por proteínas de superfície celular quanto solúveis, que atuam na lise celular, opsonização de antígenos promovendo a fagocitose, ligação a receptores desencadeando eventos imunoregulatórios e remoção de imunocomplexos da circulação (GOLDSBY *et al.*, 2002; CARROLL, 2004). A cascata do complemento é ativada pelo complexo vírus-anticorpo, além de diversas citocinas, para liberação dos elementos C3a e C5a que possuem efeito direto na permeabilidade vascular. O efeito sinérgico de IFN- α e TNF- α acabam ativando as proteínas do complemento a provocar um vazamento em células endoteliais durante infecções secundárias (SHAIO *et al.*, 1992; LEI *et al.*, 2001).

As quimiocinas são moléculas de pequeno peso molecular com atividade quimioatrativa, que podem desempenhar um papel importante na patogenia da encefalite pelo vírus da dengue. Podem ser divididas em quatro grupos, de acordo com a posição do aminoácido cisteína na sua porção N-terminal, sendo quimioatrativas para linfócitos T ativados, monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, basófilos, células NK e neutrófilos, dependendo do grupo a que pertençam (KARPUS, 2001; HUANG *et al.*, 2000). Foi visto que a quimiocina Ccl5 está envolvida no processo de patogênese de doenças neurodegenerativas, sendo demonstrada melhora significativa da função neurológica em camundongos, associada à redução da desmielinização e do acúmulo de macrófagos e células T no SNC, após a administração de anticorpos anti-Ccl5 em modelo murino de esclerose múltipla induzida pela infecção com o MHV (vírus da hepatite murina) (GLASS *et al.*, 2004). Além disso, a Ccl5 também desempenha um papel protetor em infecções virais, tendo sido demonstrado que animais deficientes para o seu receptor (CCR5) apresentaram maior suscetibilidade à infecção pelo vírus Herpes Simples-2 (HSV-2) (THAPA; KUZIEL; CARR, 2007).

Recentemente, Sariol *et al.* (2007), utilizando modelo de macacos *Rhesus*, avaliaram as alterações de perfil de expressão de citocinas após infectar esses animais com DENV1. Foi demonstrado que a infecção de linfócitos B, macrófagos e

células polimorfonucleares (PBMC) de macacos com DENV1 induz a manifestação de uma potente resposta imune após 5 dias de infecção, induzida pela expressão de genes estimulados por IFN (ISGs) que apresentam atividade antiviral. Além disso, não foi detectada a superexpressão dos genes de IFN- α , IFN- β ou IFN- γ , bem como de IL-10, IL-8, IL-6, TNF- α . A ausência dessas citocinas pode explicar porque macacos não apresentam sinais clínicos da infecção pelo vírus da dengue, apesar de serem susceptíveis à infecção e realizarem soroconversão.

Um outro estudo avaliou o perfil de expressão gênica do sangue total de pacientes com DSS e com DHF. Foram identificados 24 genes diferencialmente modulados entre esses pacientes, sendo observada uma menor taxa de transcrição gênica nos pacientes com DSS. Dentre esses genes, a maioria era induzida por IFN tipo I, sugerindo que a DSS pode ser desencadeada pela atenuação de alguns fatores da resposta imune inata (SIMMONS *et al.*, 2007).

As encefalites virais se apresentam com lesões mediadas tanto pela replicação viral quanto pela resposta imunológica do hospedeiro. A resposta imune frente a infecções por flavivírus pode provocar sérios prejuízos ao hospedeiro (KREIL; EIBL 1996; MORI *et al.*, 1997). Porém, o espectro e a intensidade das respostas imunes no SNC devem ser finamente regulados, a fim de limitar os danos, uma vez que se trata de um tecido não-regenerativo. Em algumas infecções por flavivírus, como o vírus da encefalite de St. Louis (SLEV) (MURPHY *et al.*, 1968), JEV (ESIRI, 1989; LIAO *et al.*, 1997, KUMAR *et al.*, 2009; MISHRA *et al.*, 2009), WNV (CAMENGA; NATHANSON; COLE, 1974; SHRESTHA, GOTTLIEB, DIAMOND, 2003; DAI *et al.*, 2008) e DENV (HOTTA, 1952; DESPRÈS *et al.*, 1996, 1998; DUARTE DOS SANTOS *et al.*, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2002; BORDIGNON *et al.*, 2007), têm sido observados a indução de dano e morte neuronal, associados à encefalite. A presença de antígenos do vírus da dengue foi identificada em tecido cerebral, aparentemente em neurônios, astrócitos, micróglia e células endoteliais, de um caso fatal de DHF, pela técnica de imunohistoquímica utilizando anticorpo dengue-específico. Também foram detectadas partículas virais do sorotipo 4 de DENV em amostras da medula e cerebelo do mesmo paciente (RAMOS *et al.*, 1998). Outros autores descreveram um caso fatal de dengue no Brasil no qual detectaram células com marcação positiva antígeno-específica contra dengue em neurônios e isolamento positivo para DENV2 em células do tecido cerebral, fígado e linfonodos (NOGUEIRA *et al.*, 2002).

Os dados histológicos observados nesse estudo sugerem que as principais células-alvo da infecção no SNC murino são os neurônios, principalmente os localizados no córtex frontal e temporal, além do hipocampo, regiões relacionadas ao equilíbrio e controle motor, o que indica a relação entre estas lesões e os sintomas observados nos animais infectados. Foi evidenciada a presença de infiltrado mononuclear, morte neuronal, nódulo microglial, além de meningite. Os danos de maior extensão foram identificados nos animais inoculados com os vírus E405/NS3-435 (Thr₄₀₅Ile/Leu₄₃₅Ser) e E402/NS3-480 (Phe₄₀₂Leu/Leu₄₈₀Ser), corroborando com os dados de carga viral. A presença de processo inflamatório e ativação da micróglia no SNC de camundongos infectados sugere que o processo de morte celular por necrose seja o mecanismo mais provável para o desenvolvimento de encefalite fatal nos camundongos.

Os dados obtidos nesse trabalho são muito consistentes, tendo em vista que mutações associadas com uma determinada cepa viral foram ensaiadas no contexto de uma outra cepa e seus efeitos foram analisados levando em conta diferentes aspectos com relação à infecção viral (replicação, resposta imune, dano tecidual), permitindo assim avaliar sua real importância no desenvolvimento do fenótipo de neurovirulência em camundongos.

A mutação no domínio NS3hel aumentaria a eficiência de replicação do RNA viral enquanto a mutação na proteína E poderia estar alterando a conformação da proteína, levando a uma interação mais eficiente com membranas celulares ou receptores, e potencializando a infecção.

O conjunto de resultados deste trabalho demonstrou que vírus recombinantes exibindo mutações pontuais únicas no domínio helicase da proteína NS3, associadas à mutação na região E H1^{pred} de DENV1 são capazes de exibir um fenótipo de neurovirulência em modelo murino. O desencadeamento do quadro de encefalite dos animais está diretamente relacionado com uma maior habilidade de replicação viral no SNC, produção de progênie e indução de resposta imune inata exacerbada (não-fisiológica) levando ao dano tecidual e morte.

Considerando que o conhecimento sobre as bases moleculares do processo de neuropatogênese decorrente da infecção por DENV é limitado, este modelo de estudo poderá contribuir para a determinação de bases de atenuação de cepas vacinais, processos de interação vírus/hospedeiro e fornecer novas informações

sobre os mecanismos da patogênese da dengue, podendo eventualmente nortear estratégias de controle da infecção.

6. CONCLUSÕES

- As mutações implicadas no fenótipo viral de neurovirulência da dengue foram inseridas no contexto do clone infeccioso pBACDV1, gerando vírus recombinantes capazes de replicar eficientemente em culturas de células de inseto, sendo produzidos lotes purificados em gradiente de sacarose e com altos títulos virais.
- Os vírus recombinantes gerados foram avaliados quanto à sua habilidade de causar efeito citopático em culturas de células de inseto C6/36 e foi constatado que a mutação E405 é capaz de inibir o fenótipo de fusão celular nestas culturas.
- Os animais inoculados com os vírus recombinantes NS3-435, NS3-480, E405/NS3-435 e E402/NS3-480, desenvolveram sintomas similares aos das cepas neurovirulentas, como sinais de encefalite e paralisia parcial dos membros inferiores, enquanto os grupos de animais inoculados com *mock*, e com os vírus recombinantes pBACDV1, E402, E405, NS3-209 e E402/NS3-209, não apresentaram nenhum sinal de doença.
- Alguns dos animais que apresentaram sinais de doença acabaram sucumbindo à infecção, sugerindo que as mutações NS3-435 e NS3-480 desempenhem um papel importante no desencadeamento da neuropatogênese em camundongos.
- As mutações E402 e E405 isoladas não são capazes de causar doença ou morte dos animais. Porém, quando combinadas com as mutações da proteína NS3, desempenham um papel importante desencadeando doença neurológica e morte, evidenciando um efeito sinérgico das mutações na doença e morte dos animais.
- As taxas de replicação viral no tecido cerebral foram mais expressivas nos animais inoculados com os vírus recombinantes E405/NS3-435 e E402/NS3-480, que também apresentaram as taxas de mortalidade mais altas.
- As principais células-alvo da infecção no SNC murino são os neurônios, principalmente os do córtex frontal e temporal, além do hipocampo. Estas regiões afetadas estão relacionadas ao equilíbrio e controle motor, o que explica os sintomas observados nos animais infectados.

- Todos os animais inoculados com os vírus recombinantes apresentaram danos no tecido cerebral, sendo evidenciada a presença de infiltrado mononuclear, necrose neuronal, nódulo microglial, além de meningite, moderada a aguda, e os danos de maior extensão foram identificados nos animais inoculados com os vírus recombinantes E405/NS3-435 e E402/NS3-480, resultados esses que estão diretamente relacionados com os dados de carga viral.
- Os experimentos de expressão gênica demonstraram uma maior modulação da expressão de genes relacionados a resposta imune inata, nos grupos de animais inoculados com os vírus duplo-mutantes E402/NS3-480 e E405/NS3-435, dado que indica que uma resposta imune mais exacerbada poderia estar associada a altas taxas de mortalidade.
- As assinaturas moleculares nas proteínas NS3hel e E identificadas nas cepas neurovirulentas estão diretamente envolvidas na aquisição do fenótipo, pois quando inseridas em um novo contexto, isto é, uma outra cepa viral (DENV1 BR/90), foram capazes de causar os mesmos sintomas neuropatológicos dos vírus neuroadaptados (FGA/NA-d1d e FGA/NA-P6).

7. PERSPECTIVAS

- Obter o clone triplo-mutante (E402/NS3-209/NS3-480) e caracterizar, *in vitro* e *in vivo*, o vírus recombinante resultante.
- Realizar estudos complementares sobre o papel da mutação E405 no processo de inibição do efeito citopático em culturas de células de inseto.
- Realizar ensaios funcionais (atividade helicase e ATPase) da proteína NS3 recombinante contendo as mutações Leu₄₃₅Ser e Leu₄₈₀Ser.
- Estudar a interação das proteínas NS3 mutadas, Leu₄₃₅Ser e Leu₄₈₀Ser, com outras proteínas do complexo de replicação ou fatores celulares através de ensaios de co-imunoprecipitação.
- Realizar caracterizações complementares das mutações Leu₄₃₅Ser e Leu₄₈₀Ser utilizando sistema subgenômico de replicon.
- Analisar o possível papel do caráter do resíduo de aminoácido na posição 480 da proteína NS3 no fenótipo de neurovirulência, através da clonagem e geração de vírus recombinantes com diferentes aminoácidos nesta posição.
- Realizar a caracterização funcional do papel da via de sinalização de IFN no curso da infecção com os vírus recombinantes e controles em animais *knockouts* para o receptor de IFN tipo I.

REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, S.; WONG, P.F.; CHAN, Y.F. Emergence of dengue virus type 4 genotype IIA in Malaysia. **J Gen Virol**, v.83, n.10, p.2437-42, 2002.

AHMADIAN, M.R.; STEGE, P.; SCHEFFZEK, K.; WITTINGHOFER, A. Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. **Nat Struct Biol**, v.4, n.9, p.686-9, 1997.

ALCON-LEPODER, S.; DROUET, M. T.; ROUX, P.; FRENKEL, M. P.; ARBORIO, M.; DURAND-SCHNEIDER, A. M.; MAURICE, M.; LE BLANC, I.; GRUENBERG, J.; FLAMAND, M. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. **J Virol**, v.79, n.17, p.11.403-11, 2005.

ALEN, M. M. F.; KAPTEIN, S. J. F.; BURGHGRAEVE, T. de.; BALZARINI, J.; NEYTS, J.; SCHOLS, D. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. **Virology**, v.387, n.1, p.67-75, 2009.

ALLISON, S.L.; STIASNY, K.; STADLER, K.; MANDL, C.W.; HEINZ, F.X. Mapping of functional elements in the stem-anchor region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E. **J Virol**, v.73, n.7, p. 5605-12, 1999.

ALVAREZ, D.E.; EZCURRA, A.L.D.L.; FUCITO, S.; GAMARNIK, A.V. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology**, v. 339, n. 2, p. 200-212, 2005a.

ALVAREZ, D.E.; LODEIRO, M.F.; LUDUEÑA, S.J.; PIETRASANTA, L.I.; GAMARNIK, A.V. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. **J Virol**, v. 79, n. 11, p. 6631-6643, 2005b.

AQUINO, V. H.; ANATRIELLO, E.; GONÇALVES, P. F.; SILVA, E. V.; VASCONCELOS, P. F. C.; VIEIRA, D. S.; BATISTA, W. C.; BOBADILLA, M. L.; VAZQUEZ, C.; MORAN, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. **Am J Trop Med Hyg**, v.75, n.4, p.710-15, 2006.

ASSENBERG, R.; MASTRANGELO, E.; WALTER, T.S.; VERMA, A.; MILANI, M.; OWENS, R.J.; STUART, D.I.; GRIMES, J.M.; MANCINI, E.J. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **J Virol**, v.83, p.12895-906, 2009.

AVIRUTNAN, P.; PUNYDEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSRI, A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; PUTTIKHUNT, C. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis**, v.193, p.1078-88, 2006.

BENARROCH, D.; SELISKO, B.; LOCATELLI, G. A.; MAGA, G.; ROMETTE, J. L.; CANARD, B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of dengue virus protein NS3 are Mg²⁺ - dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. **Virology**, v.328, n., p.208-18, 2004.

BENTE, D. A.; RICO-HESSE, R. Models of dengue virus infection. **Drug Discov Today Dis**, v.3, n.1, p.97-103, 2006.

BHOOPAT, L.; BHAMARAPRAVATI, N.; ATTASIRI, C.; YOKSARN, S.; CHAIWUN, B.; KHUNAMORNPONG, S.; SIRISANTHANA, V. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v.14, p.107-13, 1996.

BLANEY JR., J.E. HANSON CT, FIRESTONE CY, HANLEY KA, MURPHY BR, WHITEHEAD S.S. Genetically modified, live attenuated dengue virus type 3 vaccine candidates. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 6, p. 811-821, 2004a.

BOLLATI, M.; ALVAREZ, K.; ASSENBERG, R.; BARONTI, C.; CANARD, B.; COOK, S.; COUTARD, B.; DECROLY, E.; DE LAMBALLERIE, X.; GOULD, E.A.; GRARD, G.; GRIMES, J.M.; HILGENFELD, R.; JANSSON, A.M.; MALET, H.; MANCINI, E.J.; MASTRANGELO, E.; MATTEVI, A.; MILANI, M.; MOUREAU, G.; NEYTS, J.; OWENS, R.J.; REN, J.; SELISKO, B.; SPERONI, S.; STEUBER, H.; STUART, D.I. UNGE, T.; BOLOGNESI, M. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. **Antiviral Res**, 2009. Article *in Pres*.

BONALDO, M.C.; MELLO, S.M.; TRINDADE, G.F.; RANGEL, A.A.; DUARTE, A.S.; OLIVEIRA, P.J.; FREIRE, M.S.; KUBELKA, C.F.; GALLER, R. Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. **Virol J**, v.4, p.115, 2007.

BOOKS, A. J.; JOHANSSON, M.; CRISWELL, E; JANS, D. A; VASUDEVAN, S. G. The interdomain region of dengue NS5 protein interacts with NS3 and host proteins. **Dengue Bulletin**, v.26, p.155-161, 2002.

BORDIGNON, J.; STROTTMAN, D.M.; MOSIMANN, A.L.P.; PROBST, C.M.; STELLA, V.; NORONHA, L.; ZANATA, S.M.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in E and NS3 Helicase Domains. *Journal of Medical Virology*, v. 79, n. 10, p. 1506-1517, 2007.

BORDIGNON, J.; PROBST, C.M.; MOSIMANN, A.L.P.; PAVONI, D.P.; STELLA, V.; BUCK, G.A.; SATPROEDPRAI, N.; FAWCETT, P.; ZANATA, S.M.; DE NORONHA, L.; KRIEGER, M.A.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. **Virology**, v.377, p.319–329, 2008.

BORDIGNON, J. **Genômica funcional da neurovirulência por vírus da dengue sorotipo-1 em modelo murino**. 102 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BOROWSKI, P.; NIEBUHR, A.; MUELLER, O.; BRETNER, M.; FELCZAK, K.; KULIKOWSKI, T.; SCHMITZ, H. Purification and characterization of West Nile virus nucleoside triphosphatase (NTPase)/helicase: evidence for dissociation of the NTPase and helicase activities of the enzyme. **J Virol**, v.75, p.3220–3229, 2001.

BOYER, J.C.; HAENNI, A.N. Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses. **Virology**, v.198, p.415-426, 1994.

BRAY, M.; ZHAO, B.T.; MARKOFF, L.; ECKELS, K.H.; CHANOCK, R.M.; LAI, C.J. Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. **J Virol**, v.63, n.6, p.2853-6, 1989.

BRAY, M.; MEN, R.; TOKIMATSU, I.; LAI, J. C. Genetic Determinants Responsible for Acquisition of Dengue Type 2 Virus Mouse Neurovirulence. **J Virol**, v.72, n.2, p.1647-51, 1998.

BREDENBEEK, P.J. KOOI, E.A.; LINDENBACH, B.; HUIJKMAN, N.; RICE, C.M.; SPAAN, W.J. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. **J Gen Virol**, v.84, p.1261-1268, 2003.

BRESSANELLI, S.; STIASNY, K.; ALLISON, S.L.; STURA, E.A.; DUQUERROY, S.; LESCAR, J.; HEINZ, F.X.; REY, F.A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **EMBO J**, v.23, n.4, p.728-38, 2004.

BRYANT, J.E.; CALVERT, A.E.; MESESAN, K.; CRABTREE, M.B.; VOLPE, K.E.; SILENGO, S.; KINNEY, R.M.; HUANG, C.Y.; MILLER, B.R.; ROEHRIG, J.T. Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. **Virology**, v.366, n.2, p.415-23, 2007.

BRUENN, J.A. A structural and primary sequence comparison of the viral RNA-dependent RNA polymerases. **Nucleic Acids Res**, v.31, n.7, p.1821-9, 2003.

CALISHER, C.H. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family *Flaviviridae*) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. **Acta Virol**, v.32, n.5, p.469-78, 1988.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; SHOPE, R. E.; PORTERFIELD, J. S.; WESTAWAY, E. G.; BRANDT, W. E. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **J Gen Virol**, v.70, p.37-43, 1989.

CAM, V.B.; FONSMARK, L.; HUE, B.N.; PHUONG, T.N.; POULSEN, A.; HEEGAARD, D.E. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemaorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, p. 848-51, 2001.

CAMENGA, D.L.; NATHANSON, N.; COLE, G.A. Cyclophosphamide-potentiated West Nile viral encephalitis-Relative influence of cellular and humoral factors. **J Infect Dis**, v.130, p.634-41, 1974.

CAMPBELL, M.S.; PLETNEV, A.G. Infectious cDNA Clones of Langat Tick-Borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence. **Virology**, v. 269, p. 225-237, 2000.

CARROLL, M.C. The complement system in regulation of adaptative immunity. **Nature Immun**, v.5, p.981-986, 2004.

CARVALHO, S.E.; MARTIN, D.P.; OLIVEIRA, L.M.; RIBEIRO, B.M.; NAGATA, T. Comparative analysis of American Dengue virus type 1 full-genome sequences. **Virus Genes**, v.40, n.1, p.60-6, 2010.

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Ann Rev Microb**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHANG, H.H.; SHYU, H.F.; WANG, Y.M.; SUN, D.S.; SHYU, R.H.; TANG, S.S.; HUANG, Y.S. Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. **J Infect Dis.**, v.186, p.743-51, 2002.

CHANG, Y.S.; LIAO, C.L.; TSAO, C.H.; CHEN, M.C.; LIU, C.I.; CHEN, L.K.; LIN, Y.L. Membrane permeabilization by small hydrophobic nonstructural proteins of Japanese encephalitis virus. **J Virol**, v.73, n.8, p.6257-64, 2009.

CHAO, D.Y.; KING, C.C.; WANG, W.K.; CHEN, W.J.; WU, H.L.; CHANG, G.J.J. Strategically examining the full-genome of dengue virus type3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. **Virol J**, v.2, p.72, 2005.

CHEN, W.; KAWANO, H.; MEN, R.; CLARK, D.; LAI, C.J. Construction of Intertypic Chimeric Dengue Viruses Exhibiting Type 3 Antigenicity and Neurovirulence for Mice. **J Virol**, v.69, n.8, p. 5186–5190, 1995.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; MARKS, R.M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **J Virol**, v.70, n.12, p.8765-72, 1996.

CHEN, C.J.; KUO, M.D.; CHIEN, L.J.; HSU, S.L.; WANG, Y.M.; LIN, J.H. RNAprotein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. **J Virol**, v.71, n.5, p.3466-73, 1997.

CHIU, W.; KINNEY, R.M.; DREHER, T.W. Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. **J Virol**, v. 79, n.13, p. 8303-8315, 2005.

CHOTMONGKOL, V.; SAWANYAWISUTH, K. Case report: Dengue hemorrhagic fever with encephalopathy in an adult. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.35, n.1, p.160-1, 2004.

CHU, P.W.; WESTAWAY, E.G. Molecular and ultrastructural analysis of heavy membrane fractions associated with replication of Kunjin virus RNA. **Arch Virology**, v.125, p.177-191, 1992.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, v.80, n.23, p.11418-11431, 2006.

COCQUEREL, L.; MEUNIER, J.C.; PILLEZ, A.; WYCHOWSKI, C.; DUBUISSON, J. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. **J Virol**, v.72, n.3, p.2183-91, 1998.

COFFEY, L.L.; MERTENS, E.; BREHIN, A.C.; FERNANDEZ-GARCIA, M.D.; AMARA, A.; DESPRÉS, P.; SAKUNTABHAI, A. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and Infection**, Paris, v. 11, n. 2, p. 143-156, 2009.

COLE, G.A.; WISSEMAN, C.L. Jr. Pathogenesis of type 1 dengue virus infection in suckling, weanling and adult mice. 1. The relation of virus replication to interferon and antibody formation. **Am J Epidemiol**, v.89, n.6, p.669-80, 1969.

CORVER, J.; LENCHES, E.; SMITH, K.; ROBISON, R.A.; SANDO, T.; STRAUSS, E.G.; STRAUSS, J.H. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. **J Virol**, v.77, n.3, p.2265-2270, 2003.

CUI S.; CHESSON C.; HOPE R. Genetic variation within and between strains of outbred Swiss mice. **Lab Anim**, v.27, p.116–123, 1993.

CUI, T.; SUGRUE, R. J.; XU, Q.; LEE, A. K.; CHAN, Y. C.; FU, J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. **Virology**, v.246, n.2, p.409-17, 1998.

DAI, J.; WANG, P.; BAI, F.; TOWN, T.; FIKRIG, E. Icam-1 participates in the entry of West Nile Virus into the central nervous system. **J Virol**, v.82, n.8, p.4164-8, 2008.

DE MELO, F.L.; ROMANO, C.M.; ZANOTTO, P.M. de A. Introduction of Dengue Virus 4 (DENV-4) Genotype I into Brazil from Asia? **PLoS Negl Trop Dis**. v.3, n.4, p.e390, 2009.

DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M.P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v.196, n.1, p.209-19, 1993.

DESPRÈS, P.; FLAMAND, M.; CECCALDI, P.E.; DEUBEL, V. Human Isolates of Dengue Type 1 Virus Induce Apoptosis in Mouse Neuroblastoma Cells. **J Virol**, v.70, n.6, p. 4090–4096, 1996.

DESPRÈS P.; FRENKIEL M.P.; CECCALDI P.E.; DUARTE DOS SANTOS C.N.; DEUBEL V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. **J Virol**, v.72, p.823–829, 1998.

DIAMOND, M.S. Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. **Immunol Cell Biol**, v.81, p.196–206, 2003.

DOMINGUES, R. B.; KUSTER, G. W.; ONUKI-CASTRO, F. L.; SOUZA, V. A.; LEVI, J. E.; PANNUTI, C. S. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **J Neurol Science**, v.267, n.1-2, p.36-40, 2007.

DUARTE DOS SANTOS, C. N.; FRENKIEL, M. P.; COURAGEOT, M. P.; ROCHA, C. F.; VAZEILLE-FALCOZ, M. C.; WIEN, M. W.; REY, F. A.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**, v.274, n.2, p.292-308, 2000.

DUARTE DOS SANTOS, C.N.; ROCHA, C.F.; CORDEIRO, M.; FRAGOSO, S.P.; REY, F.; DEUBEL, V.; DESPRES, P. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Res**, v.90, n.1-2, p.197-205, 2002.

EGLOFF, M.; BENARROCH, D.; SELISKO, B.; ROMETTE, J.L.; CANARD, B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **EMBO J**, v.21, n.11, p.2757-2768, 2002.

ESIRI, M.M.; READING, M.C.; SQUIER, M.V.; HUGHES, J.T. Immunocytochemical characterization of the macrophage and lymphocyte infiltrate in the brain in six cases of human encephalitis of varied aetiology. **Neuropathol. Appl. Neurobiol**, v.15, n.4, p.289-305, 1989.

FALCONAR, A.K.; YOUNG, P.R. Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. **J Gen Virol**, v.72, p.961-5, 1991.

FALCONAR, A.K.I. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesion Proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol**, v.142, p.897-916, 1997.

FALGOUT, B.; CHANOCK, R.; LAI, C.J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. **J Virol**, v.63, n.5, p.1852-60, 1989.

FALGOUT, B.; BRAY, M.; SCHLESINGER, J.J.; LAI, C.J. Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. **J Virol**, v.64, n.9, p.4356-63, 1990.

FALGOUT, B.; PETHEL, M.; ZHANG, Y-M.; LAI, C-J. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the processing of dengue virus nonstructural proteins. **J Virol**, v.65, p.2467-75, 1991.

FERREIRA, M.L.B.; CAVALCANTI, C.G.; COELHO, C.A.; MESQUITA, S.D. Manifestações neurológicas de dengue: estudo de 41 casos. **Arq de Neuro-psiquiatria**, v. 63, n. 2-B, p. 488-493, 2005.

FIGEIREDO, R.M.P.; NAVECA, F.G; BASTOS, M.S.; MELO, M.N.; VIANA,S.S.; MOURÃO, M.P.G.; COSTA, C.A.; FARIAS, I.P. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, Atlanta, v. 14, n. 4, p. 667-669, 2008.

FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J.; REY, F.A.; DEUBEL, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosilation-dependent fashion. **J Virol**, v.73, n.7, p.6104-10, 1999.

GARCIA-RIVERA, E.J.; VORNDAM, V.; RIGAU-PÉREZ, J.G. Use of an enhanced surveillance system for encephalitis and aseptic meningitis for the detection of neurologic manifestations of dengue in Puerto Rico, 2003. **P R Health Sci J**, v.28, n.2, p.114-20, 2009.

GARCÍA-SASTRE, A.; BIRON, C.A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente. **Science**, v.312, p.879-82, 2006.

GEHRKE, R.; ECKER, M.; ABERLE, S.W.; ALLISON, S.L.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.W. Incorporation of Tick-borne encephalitis virus replicons into virus like particles by a packaging cell line. **J Virol**, v.77, n.16, p.8924-8933, 2003.

GEISS, B.J.; THOMPSON, A.A.; ANDREWS, A.J.; SONS, R.L.; GARI, H.H.; KEENAN, S.M.; PEERSEN, O.B. Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding. **J Mol Biol**, v.385, n.5, p.1643-54, 2009.

GLASS, W.G.; HICKEY, M.J.; HARDISON, J.L.; LIU, M.T.; MANNING, J.E.; LANE, T.E. Antibody Targeting of the CC Chemokine Ligand 5 Results in Diminished Leukocyte Infiltration into the Central Nervous System and Reduced Neurologic Disease in a Viral Model of Multiple Sclerosis. **J Immun**, v.172, p.4018-4025, 2004.

GOLLINS, S.W.; PORTERFIELD, J.S. PH-dependent fusion between the flavivirus West-Nile and liposomal model membranes. **J Gen Virol**, v.67, p.157-66, 1986.

GORBALENYA, A.E.; KOONIN, E.V.; DONCHENKO, A.P.; BLINOV, V.M. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. **Nucleic Acids Res**, v.17, p.4713-4729, 1989.

GOULD, E.A.; CLEGG, J.C.S. Growth, Titration and Purification of Togaviruses. *In*: MAHY, B.W.J. (ed). **Virology: a practical approach**. Washington DC: IRL Press. p. 43-78, 1985.

GRASSMANN, C.W.; ISKEN, O.; BEHRENS, S.E. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. **J Virol**, v.73, n.11, p.9196-205, 1999.

GRITSUN, T.S.; GOULD, E.A. Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR. **Virology**, v.214, p.611-618, 1995.

GROETTRUP, M.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; STANDERA, S.; STOHWASSER, R.; KLOETZEL, P.M. A third interferon-gamma induced subunit exchange in the 20S proteasome. **Eur J Immunol**, v.26, p.863-869, 1996.

GROMOWSKI, G.D.; BARRETT, A.D. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. **Virology**, v.366, n.2, p.349-60, 2007.

GUALANO, R.C.; PRYOR, M.J.; CAUCHI, M.R.; WRIGHT, P.J.; DAVIDSON, A.D. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. **J Gen Virol**, v.79, p.437-446, 1998.

GUBLER, D.J.; SUHARYONO, W.; TAN, R.; ABIDIN, M.; SIE, A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. **Bull WHO**, n.59, p.623-30, 1981.

GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. **Infect Ag Dis**, v.2, n.6, p.383-393, 1993.

GUBLER, D.J. Perspectives on the prevention and control of dengue hemorrhagic fever. **Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi**, Suppl:S15-8, 1994.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microb Rev**, v.11, n.3, p.480-496, 1998.

GUIRAKHOO, F.; PUGACHEV, K.; ARROYO, J.; MILLER, C.; ZHANG, Z.-X.; WELTZIN, R.; GEORGAKOPOULOS, K.; CATALAN, J.; OCRAN, S.; DRAPER, K.; MONATH, T.P. Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. **Virology**, v.298, p.146-159, 2002.

GUIRAKHOO, F.; PUGACHEV, K.; ZHANG, Z.; MYERS, G.; LEVENBOOK, I.; DRAPER, K.; LANG, J.; OCRAN, S.; MITCHELL, F.; PARSONS, M.; BROWN, N.; BRANDLER, S.; FOURNIER, C.; BARRERE, B.; RIZVI, F.; TRAVASSOS, A.; NICHOLS, R.; TRENT, D.; MONATH, T. Safety and efficacy of chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine formulations in nonhuman primates. **J Virol**, v.78, n.9, p.4761-4775, 2004.

GUIRAKHOO, F.; KITCHENER, S.; MORRISON, D.; FORRAT, R.; MCCARTHY, K.; NICHOLS, R.; YOKSAN, S.; DUAN, X.; ERMAK, T.H.; KANESA-THASAN, N.; BEDFORD, P.; LANG, J.; QUENTIN-MILLET, M.J.; MONATH, T.P. Live attenuated chimeric yellow fever dengue type 2 (ChimeriVaxTM – DEN2) vaccine: phase I clinical trial for safety and immunogenicity. **Hum Vaccin**, v.2, n.2, p.60-67, 2006.

GUY, B.; BARBAN, V.; MANTEL, N.; AGUIRRE, M.; GULIA, S.; PONTVIANNE, J.; JOURDIER, T.M.; RAMIREZ, L.; GREGOIRE, V.; CHARNAY, C.; BURDIN, N.; DUMAS, R.; LANG, J. Evaluation of interferences between dengue vaccine serotypes in a monkey model. **Am J Trop Med Hyg**, v.80, n.2, p.302-11, 2009.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **J Clin Virol**, v.27, p.1-13, 2003.

GWACK, Y.; KIM, D.W.; HAN, J.H.; CHOE, J. Characterization of RNA binding activity and RNA helicase activity of the hepatitis C virus NS3 protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v.225, n.2, p.654-9, 1996.

HAHN, C.S.; HAHN, Y.S.; RICE, C.M.; LEE, E.; DALGARNO, L.; STRAUSS, E.G.; STRAUSS, J.H. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **J Mol Biol**, London, v. 198, n. 1, p.33-41, 1987.

HALSTEAD, S.B.; O'ROURKE, E. J. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leucocytes. **Nature**, v.265, p.739-741, 1977.

HALSTEAD, S. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. **Science**, v.239, p.476-481, 1988.

HANNA, S.L.; PIERSON, T.C.; SANCHEZ, M.D.; AHMED, A.A.; MURTADHA, M.M.; DOMS, R.W. N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity. **J Virol**, v.79, n.21, p.13262-13274, 2005.

HASEGAWA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOSAKA, T.; FUJITA, S.; KOBAYASHI, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. **Virology**, v.191, n.1, p.158-65, 1992.

HAYASAKA, D.; GRITSUN, T.S.; YOSHII, K.; UEKI, T.; GOTO, A.; MIZUTANI, T.; KARIWA, H.; IWASAKI, T.; GOULD, E.A.; TAKASHIMA, I. Amino acid changes responsible for attenuation of virus neurovirulence in an infectious cDNA clone of the Oshima strain of tick-borne encephalitis virus. **J Gen Virol**, v.85, p.1007-1018, 2004.

HEINZ, F.X.; STIASNY, K.; PÜSCHNER-AUER, G.; HOLZMANN, H.; ALLISON, S.L.; MANDL, C.W.; KUNZ, C. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. **Virology**, v.198, n.1, p.109-17, 1994.

HEINZ, F.X.; ALLISON, S.L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Adv Virus Res**, v.59, p.63-97, 2003.

HENCHAL, E.A.; HENCHAL, L.S.; THAISOMBOONSUK, B.K. Topological mapping of unique epitopes on the dengue-2 virus NS1 protein using monoclonal antibodies. **J Gen Virol**, v.68, p.845-51, 1987.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, R. The dengue virus. **Clin Microb Review**, v.67, p.376-96, 1990.

HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, v.73, p.237-244, 1988.

HOLBROOK, M.R.; NI, H.; SHOPE, R.E.; BARRETT, A.D.T. Amino Acid Substitution(s) in the Stem-Anchor Region of Langat Virus Envelope Protein Attenuates Mouse Neurovirulence. **Virology**, v.286, p.54-61, 2001.

HOLDEN, K.L.; STEIN, D.A.; PIERSON, T.C.; AHMED, A.A.; CLYDE, K.; IVERSEN, P.L.; HARRIS, E. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. **Virology**, v.344, n.2, p.439-52, 2006.

HOLMES, E.C.; WOROBEY M.; RAMBAUT A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Mol Biol Evol**, v.16, n.3, p.405-9, 1999.

HOLMES, E.C. Patterns of intra- and interhost nonsynonymous variation reveal strong purifying selection in dengue virus. **J Virol**, v.77, n.20, p.11296-11298, 2003.

HOLZMANN, H.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.W.; GUIRAKHOO, F.; KUNZ, C. A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. **J Virol**, v.64, n.10, p.5156-9, 1990.

HOMMEL, D.; TALARMIN, A.; DEUBEL, V.; REYNES, J.M.; DROUET, M.T.; SARTHOU, J.L.; HULIN, A. Dengue encephalitis in French Guiana. **Res Virol**, v.149, n.4, p.235-8, 1998.

HOTTA, S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v.90, n.1, p.1-9, 1952.

HSIEH, S.C.; LIU, I.J.; KING, C.C.; CHANG, G.J.; WANG, W.K. A strong endoplasmic reticulum retention signal in the stem–anchor region of envelope glycoprotein of dengue virus type 2 affects the production of virus-like particles. **Virology**, v.374, p.338–350, 2008.

HUANG, K.J.; LI, S.Y.J.; CHEN, S.C.; LIU, H.S.; LIN, Y.S.; YEH, T.M.; LIU, C.C.; LEI, H.Y. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. **J Gen Virol**, v.81, p.2177–2182, 2000.

HUANG, C.Y.; BUTRAPET, S.; TSUCHIYA, K.R.; BHAMARAPRAVATI, N.; GUBLER, D.J.; KINNEY, R.M. Dengue PDK-53 virus as a chimeric carrier for tetravalent dengue vaccine development. **J Virol**, v.77, n.21, p.11436–11447, 2003.

HUANG, C.Y.; BUTRAPET, S.; MOSS, K.J.; CHILDERS, T.; ERB, S.M.; CALVERT, A.E.; SILENGO, S.J.; KINNEY, R.M.; BLAIR, C.D.; ROEHRIG, J.T. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. **Virology**, v.396, n.2, p.305–15, 2010.

HUERTA, V.; CHINEA, G.; FLEITAS, N.; SARRÍA, M.; SÁNCHEZ, J.; TOLEDO, P.; PADRÓN, G. Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. **Virus Res**, v.137, n.2, p.225–34, 2008.

IMBURGIO, D.; RONG, M.; MA, K.; MCALLISTER, W.T. Studies of promoter recognition and start site selection by T7 RNA polymerase using a comprehensive collection of promoter variants. **Biochemistry**, v.39, p.10419–10430, 2000.

JIN, Y.H.; MOHINDRU, M.; KANG, M.H.; FULLER, A.C.; KANG, B.; GALLO, D.; KIM, B.S. Differential Virus Replication, Cytokine Production, and Antigen-Presenting Function by Microglia from Susceptible and Resistant Mice Infected with Theiler's Virus. **J Virol**, v.81, n.21, p.11690–11702, 2007.

JOHANSSON, M.; BROOKES, A.J.; JANS, D.A.; VASUDEVAN, S.G. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- β and the viral helicase, NS3. **J Gen Virol**, v.82, p.735–745, 2001.

JOHNSON, A.J.; ROEHRIG, J.T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **J Virol**, v.73, p.783–786, 1999.

JONES, C.T.; MA L.; BURGNER, J.W.; GROESCH, T.D.; POST, C.B.; KUHN, R.J. Flavivirus capsid is a dimeric α -helical protein. **J Virol**, v.77, n.12, p.7143–7149, 2003.

JONES C.T.; PATKAR, C.G; KUHN, R.J. Construction and applications of yellow fever virus replicons. **Virology**, v.331, n.2, p.247-59, 2005.

KAMER, G.; ARGOS, P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal, and bacterial viruses. **Nucleic Acids Res**, n.12, p.7269-7282, 1984.

KANAI, R.; KAR, K.; ANTHONY, K.; GOULD, L.H.; LEDIZET, M.; FIKRIG, E.; MARASCO, W.A.; KOSKI, R.A.; MODIS, Y. Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. **J Virol**, v.80, n.22, p.11000-8, 2006.

KANKIRAWATANA, P.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; PUTHAVATHANA, P.; YOKSAN, S.; APINTANAPONG, S.; PONGTHAPISIT, V. Dengue infection presenting with central nervous system manifestation. **J Child Neurol**, v.15, n.8, p.544-7, 2000.

KAPOOR, M.; ZHANG, L.; RAMACHANDRA, M.; KUSUKAWA, J.; EBNER, K.E.; PADMANABHAN, R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. **J Biol Chem**, v.270, p.19100-19106, 1995a.

KAPOOR, M.; ZHANG L.; MOHAN P.M.; PADMANABHAN, R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). **Gene**, v.162, p.175-180, 1995b.

KARPUS, W.J. Chemokines and central nervous system disorders. **J Neurov**, v.7, p.493-500, 2001.

KAUFMAN, B.M.; SUMMERS, P.L.; DUBOIS, D.R.; ECKELS, K.H. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. **Am J Trop Med Hyg**, v.36, n.2, p.427-34, 1987.

KAWANO, H.; ROSTAPSHOV, V.; ROSEN, L.; LAI, C.J. Genetic Determinants of Dengue Type 4 Virus Neurovirulence for Mice. **J Virol**, v.67, n.11, p.6567-6575, 1993.

KHROMYKH, A.A.; WESTAWAY, E.G. Completion of Kunjin virus RNA sequence and recovery of an infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA. **J Virol**, v.68, n.7, p.4580-4588, 1994.

KHROMYKH, A.A.; WESTAWAY, E.G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **J Virol**, v.71, n.2, p.1497-505, 1997.

KHROMYKH, A.A.; SEDLAK, P.L.; WESTAWAY, E.G. transComplementation analysis of the flavivirus Kunjin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. **J Virol**, v. 73, p. 9247- 9255, 1999a.

KHROMYKH, A.A.; SEDLAK, P.L.; GUYATT, K.J.; HALL, R.A.; WESTAWAY, E.G. Efficient trans-complementation of the flavivirus Kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. **J Virol**, v.73, p.10272-10280, 1999b.

KHROMYKH, A.A.; MEKA, H.; GUYATT, K.J.; WESTAWAY E.G. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. **J Virol**, v.75, n.14, p.6719-28, 2001.

KIELIAN, M. Class II virus membrane fusion proteins. **Virology**, v,344, p.38–47, 2006.

KIERMAYR, S.; STIASNY, K.; HEINZ, F.X. Impact of Quaternary Organization on the Antigenic Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Glycoprotein E. **J Virol**, v.83, n.17, p.8482–8491, 2009.

KIM, K.I.; ZHANG, D.E. ISG15, not just another ubiquitin-like protein. **Biochem Biophys Res Commun**, v.307, p.431–434, 2003.

KINNEY, R.M. BUTRAPET, S.; CHANG, G.J.J.; TSUCHIYA, K.R.; ROEHRIG, J.T.; BHAMARAPRAVATI, N.; GUBLER, D.J. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK53. **Virology**, v.230, p.300-308, 1997.

KOONIN, E.V. Similarities in RNA helicases. **Nature**, v.352, p.290, 1991.

KOONIN, E. V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. **J Gen Virol**, v.74, p.733-40, 1993.

KREIL, T.R.; EIBL, M.M. Nitric oxide and viral infection-No antiviral activity against a flavivirus in vitro, and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection in vivo. **Virology**, v. 219, p. 304–30, 1996.

KROSCHEWSKI, H.; SAGRIPANTI, J.L.; DAVIDSON, A.D. Identification of amino acids in the dengue virus type 2 envelope glycoprotein critical to virus infectivity. **J Gen Virol**, v.90, p.2457-61, 2009.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. **Cell**, v.108, n.5, p.717-25, 2002.

KUMAR, S.; KALITA, J.; SAXENA, V.; KHAN, M.Y.; KHANNA, V.K.; SHARMA, S.; DHOLE, T.N.; MISRA, U.K. Some observations on the tropism of Japanese encephalitis virus in rat brain. **Brain Res**.v.1268, p.135-41, 2009.

KÜMMERER, B.M.; RICE, C. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **J Virol**, v.76, n.10, p.4773-4784, 2002.

KURANE, I.; INNIS, B.L.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; MEAGER, A.; ENNIS, F.A. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. **Am J Trop Med Hyg**, v.48, n.2, p.222-9, 1993.

KURANE, I.; ENNIS, F.A. Cytokine in dengue virus infections: Role of cytokines in the pathogenesis of dengue. hemorrhagic fever. **Sem Virol**, n.5, p.443-448, 1994.

KUROSU, T.; CHAICHANA, P.; YAMATE, M.; ANANTAPREECHA, S.; IKUTA, K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. **Biochem Biophys Res Commun**, v.362, n.4, p.1051-1056, 2007.

KWAN W.H.; HELT A.M.; MARAÑÓN C.; BARBAROUX J.B.; HOSMALIN A.; HARRIS E.; FRIDMAN W.H.; MUELLER C.G. Dendritic cell precursors are permissive to dengue virus and human immunodeficiency virus infection. **J Virol**, v. 79, n. 12, p. 7291-9, 2005.

KWAN, W.H.; NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DUMORTIER, H.; DECOSSAS, M.; VACHON, H.; DOS SANTOS, F.B.; FRIDMAN, H.W.; REY, F.A.; HARRIS, E.; DESPRES, P.; MUELLER, C.G. Dermal-type macrophages expressing CD209/DC-SIGN show inherent resistance to dengue virus growth. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.10, p.e311, 2008.

LAI, C.J.; ZHAO, B.T.; HORI, H.; BRAY, M. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.5139-5143, 1991.

LEE, E.; LOBIGS, M. Substitutions at the Putative Receptor-Binding Site of an Encephalitic Flavivirus Alter Virulence and Host Cell Tropism and Reveal a Role for Glycosaminoglycans in Entry. **J Virol**, v.74, n.19, p.8867–8875, 2000.

LEI, H.Y.; YEH, T.M.; LIU, H.S.; LIN, Y.S.; CHEN, S.H.; LIU, C.C. Immunopathogenesis of dengue virus infection. **J Biomed Sci**, v.8, p.377–388, 2001.

LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; DE CHACON RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **J Virol**, v.73, p.4738-47, 1999.

LI, H.; CLUM, S.; YOU, S.; ER, K.R.; PADMANABHAN, R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **J Virol**, v.73, p.3108-16, 1997.

LI, L.; LOK, S.M.; YU, I.M.; ZHANG, Y.; KUHN, R.J.; CHEN, J.; ROSSMANN, M.G. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science**, v.319, p.1830-1834, 2008.

LIAO, C.L.; LIN, Y.L.; WANG, J.J.; HUANG, Y.L.; YEH, C.T.; MA, S.H.; CHEN, L.K. Effect of enforced expression of human bcl-2 on Japanese encephalitis virus-induced apoptosis in cultured cells. **J Virol**, v.71, n.8, p.5963-71, 1997.

LIBRATY, D. H.; YOUNG, P. R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v.186, n.8, p.1165-68, 2002.

LIMJINDAPORN, T.; WONGWIWAT, W.; NOISAKRAN, S.; SRISAWAT, C.; NETSAWANG, J.; PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; AVIRUTNAN, P.; THIEMMECA, S.; SRIBURI, R.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P.; YENCHITSOMANUS, P.T. Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. **Biochem Biophys Res Commun**, v.379, n.2, p.196-200, 2009.

LIN, C. AMBERG, S.M., CHAMBERS, T.J.; RICE, C.M. Cleavage at a novel site in the NS4a region by the yellow fever virus NS2b-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4AAB signalase site. **J Virol**, v.67, p.2327-35, 1993.

LIN, S.R.; HSIEH, S.C.; YUEH, Y.Y.; LIN, T.H.; CHAO, D.Y.; CHEN, W.J.; KING, C.C.; WANG, W.K. Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: implications for transmission and evolution. **J Virol**, v.78, n.22, p.12717-12721, 2004.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. trans-Complementation of Yellow Fever Virus NS1 Reveals a Role in Early RNA Replication **J Virol**, v.71, p.9608–9617, 1997.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 991-1041.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. In: CHAMBERS, T.J.; MONATH, T.P. **Advances in Virus Research**, The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development, California: Elsevier Academic Press, vol. 59, p.235-289, 2003.

LING, L.M.; WILDER-SMITH, A.; LEO, Y.S. Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. **J Clin Virol**, v.38, n.3, p.265-268, 2007.

LIPTON, H.L. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. **Infect Immun**, v.11, p.1147-1155, 1975.

LIU, W.J.; CHEN, H.B.; KHROMYKH, A.A. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. **J Virol**, v.77, n.14, p.7804-13, 2003.

LIU, W.J.; CHEN, H.B.; WANG, X.J.; HUANG, H.; KHRONYKH, A.A. Analysis of Adaptive Mutations in Kunjin Virus Replicon RNA Reveals a Novel Role for the Flavivirus Nonstructural Protein NS2A in Inhibition of Beta Interferon Promoter-Driven Transcription. **J Virol**, v.78, n.22, p.12225-12235, 2004.

LO, M.K.; TILGNER, M.; BERNARD, K.A.; SHI, P.Y. Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. **J Virol**, v.77, n.18, p.10004-10014, 2003.

LOZACH, P.Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J.L.; REY, F.A.; DESPRÈS, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; AMARA, A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **J Biol Chem**, v.280, n.25, p.23698-708, 2005.

LUM, L. C. S.; LAM S. K.; CHOY, Y. S.; GEORGE, R.; HARUN, F. Dengue Encephalitis: A True Entity? **Am J Trop Med Hyg**, v.54, p. 256-9, 1996.

LUO, D. XU, T.; HUNKE, C.; GRÜBER, G.; VASUDEVAN, S.G. LESCAR, J. Crystal Structure of the NS3 Protease-Helicase from Dengue Virus. **J Virol**, v.82, n.1, p. 173–183, 2008.

MA, L.; JONES, C.T.; GROESCH, T.D.; KUHN, R.J.; POST, C. B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.101, p. 3414-3419, 2004.

MACKENZIE, J.M.; JONES, M.K.; YOUNG, P.R. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. **Virology** v.220, n.1, p.232–240, 1996.

MALAKHOV, M.P.; MALAKHOVA, O.A.; KIM, K.I.; RITCHIE, K.J.; ZHANG, D.E. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. **J Biol Chem**, v.277, p.9976–9981, 2002.

MALAKHOVA, O.A.; KIM, K.I.; LUO, J.K.; ZOU, W.; KUMAR, K.G.; FUCHS, S.Y.; SHUAI, K.; ZHANG, D.E. UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. **EMBO Journal**, v.25, n.11, p.2368-67, 2006.

MALAVIGE, G.N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D.J.; SENEVIRATNE, S.L. Dengue Viral Infections. **Postgrad Med J**, v.80, n.948, p.588-601, 2004.

MALET, H.; EGLOFF, M.P.; SELISKO, B.; BUTCHER, R.E.; WRIGHT, P.J.; ROBERTS, M.; GRUEZ, A.; SULZENBACHER, G.; VONRHEIN, C.; BRICOGNE, G.; MACKENZIE, J.M.; KHROMYKH, A.A.; DAVIDSON, A.D.; CANARD, B. Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. **J Biol Chem**, v.282, p.10678–10689, 2007.

MALET, H.; MASSÉ, N.; SELISKO, B.; ROMETTE, J.L.; ALVAREZ, K.; GUILLEMOT, J.C.; TOLOU, H.; YAP, T.L.; VASUDEVAN, S.; LESCAR, J.; CANARD, B. The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. **Antiviral Res**, v.80, p.23–35, 2008.

MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **J Mol Biol**, v.53, p.159-62, 1970.

MANDL, C.W.; GUIRAKHOO, F.; HOLZMANN, H.; HEINZ, F.X.; KUNZ, C. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. **J Virol**, v.63, p.564-571, 1989.

MANGADA, M.N.M.; IGARASHI, A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virology**, v.244, p.458-66, 1998.

MASTRANGELO, E.; MILANI, M.; BOLLATI, M.; SELISKO, B.; PEYRANE, F.; PANDINI, V.; SORRENTINO, G.; CANARD, B.; KONAREV, P.V.; SVERGUN, D.I.; DE LAMBALLERIE, X.; COUTARD, B.; KHROMYKH, A.A.; BOLOGNESI, M. Crystal structure and activity of Kunjin virus NS3 helicase; protease and helicase domain assembly in the full length NS3 protein. **J Mol Biol**, v.372, n.2, p.444-55, 2007.

MATEU, G.P.; MARCHEVSKY, R.S.; LIPRANDI, F.; BONALDO, M.C.; COUTINHO, E.S.F.; DIEUDONNÉ, M.; CARIDE, E.; JABOR, A.V.; FREIRE, M.S.; GALLE, R. Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1 recombinant virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.101, n.3, p. 289-298, 2007.

MATUSAN, A.E.; PRYOR, M.J.; DAVIDSON, A.D.; WRIGHT, P.J. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. **J Virol**, v.75, n.20, p.9633-43, 2001.

MEYERS, G.; THIEL, H.J; RÜMENAPF, T. Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. **J Virol**, v.70, n.3, p.1588-95, 1996.

MIAGOSTOVICH, M.P.; RAMOS, R.G.; NICOL, A.F.; NOGUEIRA, R.M.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; MARCHEVSKY, R.S.; MESQUITA, R.P.; SCHATZMAYR, H.G. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol**, v.16, n.4, p.204-208, 1997.

MIAGOSTOVICH, M.P.; RAMOS, R.G.; NICOL, A.F.; NOGUEIRA, R.M.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; MARCHEVSKY, R.S.; MESQUITA, R.P. SCHATZMAYR, H.G. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol**, v.16, n.4, p.204-8, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue diagnóstico e manejo clínico. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 24p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Dengue no Brasil – Informe epidemiológico 17/2009. Disponível em: <www.combatadengue.com.br/downloads/boletimEpidemiologico_n026.pdf>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Campanha contra dengue. Disponível em: <www.combatadengue.com.br>

MISHRA, M.K.; DUTTA, K.; SAHEB S.K.; BASU, A. Understanding the molecular mechanism of blood-brain barrier damage in an experimental model of Japanese encephalitis: correlation with minocycline administration as a therapeutic agent. **Neurochem Int**. v.55, n.8, p.717-23, 2009.

MISRA, U.K.; KALITA, J.; SYAM, U.K.; DHOLE, T.N. Neurological manifestations of dengue virus infection. **J Neurol Sci**, v.244, n.1, p.117-122, 2006.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **PNAS**, v.100, n.12, p.6986-6991, 2003.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v.427, n.6972, p.313-319, 2004.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Variable surface epitopes in the chystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **J Virol**, v.79, p.1223-1231, 2005.

MONATH, T. P. Yellow fever and dengue: the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. **Sem Virol**, v.5, n.2, p.133-145, 1994.

MONATH, T. P.; ARROYO, J.; LEVENBOOK, I.; ZHANG, Z-X.; CATALAN, J.; DRAPER, K.; GUIRAKHOO, F. Single mutation in the lavivirus envelope protein hinge region increases neurovilulence for mice and monkeys but decreases viscerotropism for monkeys: relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines. **J Virol**, v.76, n.4, 2002.

MONATH, T.P.; MYERS, G.A.; BECK, R.A.; KNAUBER, M.; SCAPPATICCI, K.; PULLANO, T.; ARCHAMBAULT, W.T.; CATALAN, J.; MILLER, C.; ZHANG, Z.X.; SHIN, S.; PUGACHEV, K.; DRAPER, K.; LEVENBOOK, I.S.; GUIRAKHOO F. Safety testing for neurovirulence of novel live, attenuated flavivirus vaccines: Infant mice provide anaccurate surrogate for the test in monkeys. **Biologicals**, v. 33, p. 131-144, 2005.

MONDOTE, J.A.; LOZACH, P.Y.; AMARA, A.; GAMARNIK, A.V. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. **J Virol**, v.81, n.13, p.7136-48, 2007.

MORI, M.; KURANE, I.; JANUS, J.; ENNIS, F.A. Cytokine production by dengue virus antigen-responsive human T lymphocytes in vitro examined using a double immunocytochemical technique. **J Leukoc Biol**, v.61, n.3, p.338-45, 1997.

MOSIMANN A. L.P.; BORBA L.; BORDIGNON J.; MASON P.W.; DUARTE DOS SANTOS C.N. Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02). **J Virol Meth**, v.163, p.147-152, 2010.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. A structural perspective of flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, v.3, p.13-22, 2005.

MUÑOZ-JORDAN, J.L.; SANCHEZ-BURGOS, G.G.; LAURENT-ROLLE, M.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, p.14333-14338, 2003.

MUÑOZ-JORDAN, J.L.; LAURENT-ROLLE, M.; ASHOUR, J.; MARTINEZSOBRIDO, L.; ASHOK, M.; LIPKIN, W.I.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **J Virol**, v.79, p.8004-13, 2005.

MURPHY, F.A.; HARRISON, A.K.; GARY, G.W.; WHITFIELD, M.S.; FORRESTER F.T. St. Louis encephalitis virus infection of mice. **Lab Invest**, v.19, p.652-62, 1968.

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of nonstructural proteins in virion morphogenesis. **Nature Rev Microbiol**, v.6, n.9, p.699-708, 2008.

MUYLAERT, I.R.; GALLER, R.; RICE, C.M. Genetic analysis of yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **J Virol**, v.71, p.291-298, 1997.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; ALTMAYER, R.; AMARA, A.; SCHWARTZ, O.; FIESCHI, F.; VIRELIZIER, J.L.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DESPRES P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito- cell-derived dengue viruses. **EMBO Rep**, v.4, p.1-6, 2003.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; DESPRÈS, P.; CEDILLO-BARRÓN, L. Innate Immune Response to Dengue Virus. **Arch Med Res**, v.36, p.425-435, 2005.

NAYAK, V.; DESSAU, M.; KUCERA, K.; ANTHONY, K.; LEDIZET, M.; MODIS, Y. Crystal Structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. **J Virol**, v.83, n.9, p.4338-4344, 2009.

NG, Y.C.; GU, F.; PHONG, W.Y.; CHEN, Y.L.; LIM, S.P.; DAVIDSON, A.; VASUDEVAN, S.G. Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing. **Antiviral Res**, v.76, n.3, p.222-231, 2007.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS H. B. JR.; DEERFIELD, D. W. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, **EMBNEW. NEWS**, v.4, p.14, 1997.

NICKELLS, J.; CANNELLA, M.; DROLL, D.A.; LIANG, Y.; WOLD, W.S.; CHAMBERS, T.J. Neuroadapted yellow fever virus strain 17D: a charged locus in domain III of the E protein governs heparin binding activity and neuroinvasiveness in the SCID mouse model. **J Virol**, v.82, n.24, p.12510-9, 2008.

NOGUEIRA R.M.R.; MIAGOSTOVICH M.P.; LAMPE E.; SCHATZMAYR H.G.
Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85,
n. 2, p. 253, 1990.

NOGUEIRA, R.M.R.; MIAGOSTOVICH, M.P.; FILIPPIS, A.M.; PEREIRA, M.A.;
SCHATZMAYR, H.G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst
Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, p.925-6, 2001.

NOGUEIRA, R.M.R.; FILIPPIS, A.M.B.; COELHO, J.C.O.; SEQUEIRA, P.C.;
SCHATZMAYR, H.G.; PAIVA, F.G.; RAMOS, A.M.O.; MIAGOSTOVICH, M.P.
Dengue virus in Central Nervous System (CNS) in Brazil. **Southeast Asian J Trop
Med Public Health**, v.33, n.1, p.68-71, 2002.

NOGUEIRA, R.M.R.; SCHATZMAYR, H.G.; DE FILIPPIS, A.M.; DOS SANTOS, F.B.;
DA CUNHA, R.V.; COELHO, J.O.; DE SOUZA, L.J.; GUIMARÃES, F.R.; DE
ARAÚJO, E.S.; DE SIMONE, T.S.; BARAN, M.; TEIXEIRA JR, G.; MIAGOSTOVICH
M.P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.9, p. 1376-81,
2005.

NOGUEIRA, R.M.R.; ARAÚJO, J.M.G.; SCHATZMAYR, H.G. Dengue viruses in
Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.22, n.5, p.358-363,
2007.

NYBAKKEN, G.E.; NELSON, C.A.; CHEN, B.R.; DIAMOND, M.S.; FREMONT, D.H.
Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. **J Virol**, v.80, n.23,
p.11467-74, 2006.

OP DE BEECK, A.; ROUILLÉ, Y.; CARON, M.; DUVET, S.; DUBUISSON, J. The
transmembrane domains of the prM and E proteins of yellow fever virus are
endoplasmic reticulum localization signals. 2004

PALMA-da-CUNHA-MATTA, A.; SOARES-MORENO, S.A.; CARDOSO-DE
ALMEIDA, A.; AQUILERA-DE-FREITAS, V.; CAROD-ARTAL, F.J. Neurological
complications arising from dengue virus infection. **Ver Neuro**, v. 39, p. 233-37, 2004.

PANDEY, B.D.; IGARASHI, A. Severity-related molecular differences among
nineteen strains of dengue type 2 viruses. **Microbiol Immunol**, v.44, n.3, p.179-88,
2000.

PANG, X.; ZHANG, M.; DAYTON A. I. Development of dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. **BMC Microbiology**, 1:18, 2001.
Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=56997>>.

PASIEKA, J.T.; BAAS, T.; CARTER, S.V.; PROLL, C.S.; KATZE, G.M.; LEIB, A.D. Functional Genomics Analysis of Herpes Simplex Virus Type 1 Counteraction of the Host Innate Response. **J Virol**, v.80, n.15, p.7600-7612, 2006.

PATEY, O.; OLLIVAUD, L.; BREUIL, J.; LAFAIX, C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **Am J Trop Med Hyg**, v.48, n.6, p.793-802, 1993.

PATKAR, C.G.; KUHN, R.J. Yellow Fever Virus NS3 Plays an Essential Role in Virus Assembly Independent of Its Known Enzymatic Functions. **J Virol**, v.82, n.7, p.3342–3352, 2008.

PERERA, R; KUHN, R.J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microb**, v.11, n.4, p.1-9, 2008.

PIERRO, D.J.; SALAZAR, M.I.; BEATY, B.J.; OLSON, K.E. Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. **J Gen Virol**, v.87, p.2263-2268, 2006.

PLETNEV, A. G. Infectious cDNA clone of attenuated Langat tick-borne flavivirus (strain E5) and a 3' deletion mutant constructed from it exhibit decreased neuroinvasiveness in immunodeficient mice. **Virology**, v.282, p.288-300, 2001.

POERSCH C.P.O.; PAVONI, DP, QUEIROZ, M.H.; DE BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; DOS SANTOS C.N.; KRIEGER, M.A. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **J Clin Virol**, p. 32, v. 4, p. 272-77, 2005.

POLO, S.; KETNER, G.; LEVIS, R.; FALGOUT, B. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. **J Virol**, v.71, p.5366–5374, 1997.

PRESTWOOD, T.R.; PRIGOZHIN, D.M.; SHARAR, K.L.; ZELLWEGE, R.M.; SHRESTA, S. A mouse-passaged dengue virus strain with reduced affinity for heparan sulfate causes severe disease in mice by establishing increased systemic viral loads. **J Virol**, v.82, n.17, p.8411-21, 2008.

PRYOR, M.J.; RAWLINSON, S.M.; BUTCHER, R.E.; BARTON, C.L.; WATERHOUSE, T.A.; VASUDEVAN, S.G.; BARDIN, P.G.; WRIGHT, P.J.; JANS, D.A.; DAVIDSON, A.D. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. **Traffic**, v.8, p.795-807, 2007

PUCCIONI-SOHLER, M.; SOARES, C.N.; PAPAIZ-ALVARENGA, R.; CASTRO, M.J.; FARIA, L.C.; PERALTA, J. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. **Neurology**, v.73, n.17, p.1413-7, 2009.

PURI, B.; POLO, S.; HAYES, C.G.; FALGOUT, B. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus western pacific, 74 strain. **Virus Genes**, v.20, n.1, p.57-63, 2000.

PURDY, D.E.; CHANG, G.J. Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. **Virology**, v.333, n.2, p.239-50, 2005.

RAMIREZ, A.H.; MOROS, Z.; COMACH, G.; ZAMBRANO, J.; BRAVO, L.; PINTO, B.; VIELMA, S.; CARDIER, J.; LIPRANDI, F. Evaluation of dengue NS1 antigen detection tests with acute sera from patients infected with dengue virus in Venezuela. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.65, n.3, p.247-53, 2009.

RAMOS, C.; SÁNCHEZ, G.; PANDO, H. R.; BAQUERA, J.; HERNÁNDEZ, D.; MOTA, J.; RAMOS, J.; FLORES, A.; LLAUSÁS, E. Dengue virus in the brain of fatal case of hemorrhagic dengue fever. **J Neurovirol**, v.4, p.465-8, 1998

RANDOLPH, V.B; STOLLAR, V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. **J Gen Virol**, v.71, p.1845-1850, 1990.

REY, F.A.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HARRISON, S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2Å resolution. **Nature**, v.375, p.291-8, 1995.

RICE, M.C.; O'BRIEN, S.J. Genetic variance of laboratory outbred Swiss mice. **Nature** v.283, p.157-161, 1980.

RICE, C.M.; AEBERSOLD, R.; TELOW, D. B.; PATA, J.; BELL, J.R.; VORNDAM, A.V.; TRENT, D.W.; BRANDRISS, M.W.; SCHLESINGER, J.J.; STRAUSS, J.H. Partial N-terminal amino acid sequences of three nonstructural proteins of two flaviviruses. **Virology**, v.151, p.1 -9, 1986.

RICE, C.M.; GRAKOU, A.; GALLER, R.; CHAMBERS, T.J. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. **New Biol**, v.1, n.3, p.285-296, 1989.

RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. New York: Raven Press, 1996. p.931-60.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L.M.; SALAS, R.A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; DE MESA, M.T.R.; NOGUEIRA, R.M.R; DA ROSA, A.T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v.230, p.244-251, 1997.

RICO-HESSE, R. Dengue Virus Virulence and Transmission Determinants. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.338, p.45-5, 2010.

RIGAU-PÉREZ, J.; CLARK, G.; GUBLER, D.; REITER, P.; SANDERS, E.; VORNDAM, A. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v.352, p.971– 977, 1998.

ROSSI, S.L.; ZHAO, Q.; O'DONNELL, V.K.; MASON, P.W. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. **Virology**, v.331, p.457-470, 2005.

ROTHMAN, A. L. Viral pathogenesis of dengue infections. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, New York: CAB International, 1997.

ROTHMAN, A.L.; ENNIS, F.A., Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology**, n. 257, p. 1-6, 1999.

ROW, D.; WEINSTEIN, P.; MURRAY-SMITH, S. Dengue fever with encephalopathy in Australia. **Am J Trop Med Hyg**, v.54, n.3, p.253-5, 1996.

RUECKERT, R.R. – Picornaviridae and their replication. In: **Virology**. Fields, B.N.; KNIPE, R.M.; CHANOCK, M.S.; HIRSCH, J.L.; MELNICK, T.P. Monath & B. Roizman, (Eds.). Raven New York, 1996.

RUGGLI, N.; RICE, C. M. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. **Advances in Virus Research**, New York, v. 53, p. 183-207, 1999.

RYMAN, K.D.; XIE, H.; LEDGER, T.N.; CAMPBELL, G.A.; BARRETT, A.D. Antigenic variants of yellow fever virus with an altered neurovirulence phenotype in mice. **Virology**, v.230, n.2, p.376-80, 1997.

SABIN, A.B.; SCHLESINGER, R.W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v.101, p.640-642, 1945.

SABIN, A.B. Research on dengue during World War II. **Am J Trop Med Hyg**, v. 1, p. 30-50, 1952.

SAKUNTABHAI, A.; TURBPAIBOON, C.; CASADÉMONT, I.; CHUANSUMRIT, A.; LOWHNOO, T.; KAJASTE-RUDNITSKI, A.; KALAYANAROOJ, S.M.; TANGNARARATCHAKIT, K.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; VASANAWATHANA, S.; CHAIYARATANA, W.; YENCHITSOMANUS, P.T.; SURIYAPHOL, P.; AVIRUTNAN, P.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; MATSUDA, F.; YOKSAN, S.; JACOB, Y.; LATHROP, G.M.; MALASIT, P.; DESPRÈS, P.; JULIER, C. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nat Genet**, v.37, n.5, p.507-13, 2005.

SAMPATH, A.; Xu, T.; Chao, A.; Luo, D.; Lescar, J.; Vasudevan, S.G. Structure-Based Mutational Analysis of the NS3 Helicase from Dengue Virus. **J Virol**, v.80, n.13, p. 6686–6690, 2006.

SÁNCHEZ, I.J.; RUIZ, B.H. A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. **J Gen Virol**, v.77, p. 2541-2545, 1996.

SANTOS, N.Q.; AZOUBEL A.C.B.; LOPES, A.A.; COSTA, G.; BACELLAR, A. *Guillain-Barré* syndrome in the course of dengue. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v.62, n.1, p.144-146, 2004.

SCHATZMAYR, H.G.; NOGUEIRA R.M.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.81, p.245- 46, 1986.

SCHMID, S.R.; LINDER, P. D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. **Mol Microbiol**, v.6, n.3, p.283-91, 1992.

SCHOLLE, F.; GIRARD, Y.A.; ZHAO, Q.; HIGGS, S.; MASON, P.W. trans-packaged West Nile virus-like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito vectors. **J Virol**, v.78, n.21, p.11605-11614, 2004.

SEIJO, A.; CERNIGOI, B.; DEODATO, B. Dengue imported from Paraguay to Buenos Aires. Clinical and epidemiological report of 38 cases. **Medicina (B Aires)**, v.61, n.2, p.137-41, 2001.

SHAIO, M.F.; CHANG, F.Y.; HOU, S.C. Complement pathway activity in serum from patients with classical dengue fever. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.86, p.672-675, 1992.

SHI, P.; TILGNER, M.; LO, M. K. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. **Virology**, v.296, p.219-233, 2002.

SHI, P.Y.; TILGNER, M.; LO, M.K.; KENT, K.A.; BERNARD, K.A. Infectious cDNA clone of the epidemic West Nile virus from New York city. **J Virol**, v.76, n.12, p.5847-5856, 2002.

SHRESTA, S.; KYLE, J.L.; SNIDER, H.M.; BASAVAPATNA, M.; BEATTY, P.R.; HARRIS, E. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **J Virol**, v.78, p.2701-2710, 2004.

SHRESTA, S.; SHARAR, K.L.; PRIGOZHIN, D.M.; BEATTY, P.R.; HARRIS, E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. **J Virol**, v.80, n.20, p.10208-17, 2006.

SHRESTHA, B.; GOTTLIEB, D.; DIAMOND, M.S. Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus. **J Virol**, v.77, n.24, p.13203-13, 2003.

SHU, P.Y.; CHEN, L.K.; CHANG, S.F.; YUEH, Y.Y.; CHOW, L.; CHIEN, L.J.; CHIN, C.; LIN, T.H.; HUANG, J.H. Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. **J Med Virol**, v.62, n.2, p.224-32, 2000.

SILER, J.F.; HALL, M.W.; HITCHENS, A.P. Dengue: Its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. **The Philippine Journal of Science**, v.29, p.1-252, 1926.

SINGLETON, M.R.; WIGLEY, D.B. Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. **J Bacteriol**, v.184, n.7, p.1819-26, 2002.

SOLOMON, T.; DUNG, M.N.; VAUGHN, W.D.; KNEEN, R.; THAO, T.T.L.; RAENGSAKULRACH, B.; LOAN, T.H.; DAY, J.P.N.; FARRAR, J.; MYINT, A.S.K.; WARRELL, J.M.; JAMES, S.W.; NISALAK, A.; WHITE, J.N. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, v.355, p.1053-9, 2000.

STIASNY, K.; FRITZ, R.; PANGERL, K.; HEINZ, F.X. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. **Amino Acids**. 2009.

Disponível em < www.springerlink.com/content/l0147203jh354154/fulltext.pdf>

STROTTMANN, D. **Neuroadaptação de vírus dengue em modelo murino: identificação de marcadores moleculares**. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SUMARMO, H.W.; JAHJA, E.; GUBLER, D.J.; SUTOMENGGOLO, T.S.; SAROSO, S.J. Encephalopathy associated with dengue virus. **Lancet**, p.449-50, 1978.

SUMARMO, H.W.; JAHJA, E.; GUBLER, D.J.; SUHARYONO, W.; SORENSEN, K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. **Bull WHO**, v.61, p.693-701, 1983.

SUMIYOSHI, H.; HOKE, C.H.; TRENT, D.W. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. **J Virol**, v.66, n.9, p.5425-5431, 1992.

SUN, W.; NISALAK, A.; GETTAYACAMIN, M.; ECKELS, K.H.; PUTNAK, J.R.; VAUGHN, D.W.; INNIS, B.L.; THOMAS, S.J.; ENDY, T.P. Protection of Rhesus monkeys against dengue virus challenge after tetravalent live attenuated dengue virus vaccination. **J Infect Dis**, v.193, n.12, p.1658-65, 2006.

SUN, D.S.; KING, C.C.; HUANG, H.S.; SHIH, Y.L.; LEE, C.C.; TSAI, W.J.; YU, C.C.; CHANG, H.H. Antiplatelet autoantibodies elicited by dengue virus non-structural protein 1 cause thrombocytopenia and mortality in mice. **J Thromb Haemost**, v.5, n.11, p.2291-9, 2007.

SUZUKI, R.; DE BORBA, L.; DUARTE DOS SANTOS, C.N.; MASON, P.W. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, v.326, n.2, p.374-83, 2007.

TAJIMA, S.; NUKUI Y.; ITO M.; TAKASAKI T.; KURANE I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. **Virus Res**, v.116, p.38-44, 2006.

TAJIMA, S.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. **Virus Genes**, v.36, n.2, p.323-9, 2008.

TAJIMA, S.; NEROME, R.; NUKUI, Y.; KATO, F.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice. **Virology**, v.396, p.298-304, 2010.

TAKEGAMI, T.; SAKAMURO, D.; FURUKAWA, T. Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities. **Virus Genes**, v.9, n.2, p.105-12, 1995.

TAPIA-CONYER, R.; MÉNDEZ-GALVÁN, J. F.; GALLARDO-RINCÓN, H. The growing burden of dengue in Latin America. **J Clin Virol**, v.46, 2009.

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHERER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M.A.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D.L.; STEINMAN, R.M.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M. A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection in human dendritic cells. **J Exp Med**, v.197, p.823-9, 2003.

TEIXEIRA, M.G.; COSTA, M. DA C.; BARRETO, F.; BARRETO, M.L. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v.25, supl.1, 2009.

THAPA, M.; KUZIEL, W.A.; CARR, D.J.J. Susceptibility of CCR5-Deficient Mice to Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Is Linked to NK Cell Mobilization. **J Virol**, v.81, n.8, p.3704-3713, 2007.

THOMAS, S.J.; STRICKMAN, D.; VAUGHN, D.W. Dengue Epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. In: CHAMBERS, T.J. & MONATH, T.P. **Advances in Virus Research**, The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development, California: Elsevier Academic Press, v.61, p.235-289, 2003.

TOLOU, H.J.; COUISSINIER-PARIS, P.; DURAND, J.P.; MERCIER, V.; DE PINA, J.J.; DE MICCO, P.; BILLOIR, F.; CHARREL, R.N.; DE LAMBALLERIE, X. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. **J Gen Virol**, v.82, n.6, p.1283-90, 2001.

TUTEJA, N.; TUTEJA, R. Unraveling DNA helicases: Motif, structure, mechanism and function. **Eur J Biochem**, v. 271, n. 10, p. 1.849-63, 2004.

UMAREDDY, I.; CHAO, A.; SAMPATH, A.; GU, F.; VASUDEVAN, S.G. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J Gen Virol**, v.87, p.2605–2614, 2006.

UTAMA, A.; SHIMIZU, H.; HASEBE, F.; MORITA, K.; IGARASHI, A.; SHOJI, I.; MATSUURA, Y.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K.; HAGIWARA, A.; MIYAMURA, T. Role of the DExH motif of the Japanese encephalitis virus and hepatitis C virus NS3 proteins in the ATPase and RNA helicase activities. **Virology**, v.273, p.316–324, 2000a.

UTAMA, A.; SHIMIZU, H.; MORIKAWA, S.; HASEBE, F.; MORITA, K.; IGARASHI, A.; HATSU, M.; TAKAMIZAWA, K.; MIYAMURA, T. Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. **FEBS Lett**, v.465, p.74–78, 2000b.

UZCATEGUI, N. Y.; CAMACHO, D.; COMACH, G.; UZCATEGUI, R. C.; HOLMES, E. C.; GOULD, E. A. Molecular epidemiology of dengue type2 virus in Venezuela: evidence for *in situ* virus evolution and recombination. **J Gen Virol**, v.82, p.2945-53, 2001.

VAN DEN EYNDE, B.J; MOREL, S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. **Curr Opin Immunol**, v.13, p.147-53, 2001.

VAN DER MOST, R.G.; CORVER, J.; STRAUSS, J.H. Mutagenesis of the RGD motif in the yellow fever virus 17D envelope protein. **Virology**, v.265, p.83–95, 1999.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S.C. The history and evolution of human dengue emergence. **Adv Virus Res**, v.72, p.1-76, 2008.

VILLORDO, S.M.; GAMARNIK, A.V. Genome cyclization as strategy for flavivirus RNA replication. **Virus Res**, v.139, n.2, p.230-239, 2009.

WAHALA, W.M.; KRAUS, A.A.; HAYMORE, L.B.; ACCAVITTI-LOPER, M.A.; DE SILVA, A.M. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, v.392, n.1, p.103-13, 2009.

WANG, S.H.; SYU, W.J.; HUANG, K.J.; LEI, H.Y.; YAO, C.W.; KING, C.C.; HU, S.T. Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. **J Gen Virol**, v.83, p.3093-4102, 2002.

WANG, C.C, HUANG, Z.S.; CHIANG, P.L.; CHEN, C.T.; WUA, H.N. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. **FEBS Letters**, v.583, p.691–696, 2009.

WARRENER, P.; TAMURA, J.K.; COLLETT, M.S. RNA-stimulated NTPase activity associated with yellow fever virus NS3 protein expressed in bacteria. **J Virol**, v.67, n.2, p.989-96, 1993.

WEAVER, S.C.; BARRET, A.D.T. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews**, v.2, p.789-801, 2004.

WEBSTER, D.P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. **Lancet Infect Dis**, v.9, n.11, p.678-87, 2009.

WENGLER, G.; WENGLER, G. The carboxy-terminal part of the NS3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA- stimulated NTPase. **Virology**, n.184, p.707-715, 1991.

WESTAWAY, E.G. Flavivirus replication strategy. **Adv Virus Res**, v.33, p.45-90, 1987.

WESTAWAY, E.G.; MACKENZIE, J.M.; KHROMYKH, A.A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. **Adv Virus Res**, v.59, p.99-140, 2003.

WILLIAMS, K.L.; ZOMPI, S.; BEATTY, P.R.; HARRIS, E. A Mouse Model for Studying Dengue Virus Pathogenesis and Immune Response. **Ann N Y Acad Sci**, v.1171 Suppl 1:E12-23, 2009.

WINKLER, G.; RANDOLPH, V.B.; CLEAVES, G.R.; RYAN, T.E.; STOLLER, V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology**, v.162, p.187-96, 1988.

WINKLER, G.; MAXWELL, S.E.; RUEMMLER, C.; STOLLAR, V. Newly synthesized dengue -2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membraneassociated after dimerization. **Virology**, n.171, p.302-5, 1989.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2a ed. Geneva : World Health Organization, 1997. 84p.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. What is dengue and how is it treated? Geneva, Switzerland: World Health Organization.
<<http://www.who.int/features/qa/54/en/>>. Acesso em 2007.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disease distribution maps, 2008.
<gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png>

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vector distribution and bioecology.
<http://www.searo.who.int/LinkFiles/Dengue_chap-7.pdf>. Acesso em 2009.

WU, J.; BERA, A.K.; KUHN, R.J.; SMITH, J.L. Structure of the Flavivirus Helicase: Implications for Catalytic Activity, Protein Interactions, and Proteolytic Processing. **J Virol**, v.79, n.16, p.10268–10277, 2005.

XU, T.; SAMPATH, A.; CHAO, A.; WEN, D.; NANA, M.; CHENE, P.; SUBHASH, G.; LESCAR, J. Structure of the dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4Å. **J Virol**, v.79, n.16, p.10278-88, 2005.

YAMAMOTO, Y.; TAKASAKI, T.; YAMADA, K.; KIMURA, M.; WASHIZAKI, K.; YOSHIKAWA, K.; HITANI, A.; NAKAMURA, T.; IWAMOTO, A. Acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. **J Infect Chemother**, v.8, n.2, p.175-7, 2002.

YAMASHITA, T.; UNNO, H.; MORI, Y.; TANI, H.; MORIISHI, K.; TAKAMIZAWA, A.; AGOH, M.; TSUKIHARA, T.; MATSUURA, Y. Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å. **Virology**, v.373, p.426–436, 2008.

YAMSHCHIKOV, V.; WENGLER, G.; PERELYGIN, A.A.; BRINTON, M.A.; COMPANS, R.W. An infectious clone of the West Nile flavivirus. **Virology**, v.281, p.294–304, 2001.

YAP, T.L.; XU, T.; CHEN, Y.L.; MALET, H.; EGLOFF, M.P.; CANARD, B.; VASUDEVAN, S.G.; LESCAR, J. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. **J Virol.** v.81, p.4753–4765, 2007.

YAUCH, L.E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. **Antiviral Res**, v.80, n.2, p.87–93, 2008.

YOSHII, K.; HOLBROOK, M. R. Sub-genomic replicon and virus-like particles of Omsk hemorrhagic fever virus. **Arch Virol**, v.154, p.573–580, 2009.

YU, L.; ROBERT PUTNAK, J.; PLETNEV, A.G.; MARKOFF, L. Attenuated West Nile viruses bearing 3'SL and envelope gene substitution mutations. **Vaccine**. v.26, n.47, p.5981–8, 2008.

YUN, S.I.; KIM, S.Y.; RICE, C.M.; LEE, Y.M. Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. **J Virol**, v.77, n.11, p.6450–6465, 2003.

YUN, S.I.; CHOI, Y.J.; YU, X.F.; SONG, J.Y.; SHIN, Y.H.; JU, Y.R.; KIM, S.Y.; LEE, Y.M. Engineering the Japanese encephalitis virus RNA genome for the expression of foreign genes of various sizes: Implications for packaging capacity and RNA replication efficiency. **J Neurovirol**, v.13, n.6, p.522–535, 2007.

ZHANG, Y.; ZHANG, W.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; STRAUSS, J.H.; BAKER, T.S.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, v.12, n.9, p.1607–18, 2004.

ZHANG, S.; LI, L.; WOODSON, S.E.; HUANG, C.Y.; KINNEY, R.M.; BARRETT, A.D.; BEASLEY, D.W. A mutation in the envelope protein fusion loop attenuates mouse neuroinvasiveness of the NY99 strain of West Nile virus. **Virology**. v.353 n.1, p.35-40, 2006.

ZHAO, W.; FAN, B.; HU, Z.; CHEN, S.; WANG, P.; YUAN, X.; LI, X.; YU, M.; QIN, E.; YANG, P. Study on the determinants of suckling mice neurovirulence of dengue 2 virus. **Science in China**, v.46, n.1, p.95-103, 2003.

ZHAO, Z.; DATE, T.; LI, Y.; KATO, T.; MIYAMOTO, M.; YASUI, K.; WAKITA, T. Characterization of the E-138 (Glu/Lys) mutation in Japanese encephalitis virus by using a stable, full-length, infectious cDNA clone. **J Gen Virol**, v.86, v.8, p.2209-20, 2005.

ZHOU, Y.; RAY, D.; ZHAO, Y.; DONG, H.; REN, S.; LI, Z.; GUO, Y.; BERNARD, K.A.; SHI, P.Y.; LI, H. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. **J Virol**, v.81, n.8, p.3891-903, 2007.

APÊNDICE

A. ARTIGOS PUBLICADOS

SUZUKI, R.; BORBA, L.; DUARTE DOS SANTOS, C.N.; MASON, P.W. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology**, v. 362, p. 374-383, 2007.

NOGUEIRA, M.B.; STELLA, V.; BORDIGNON, J.; BATISTA, W.C.; BORBA, L.; SILVA, L.H.P.; HOFFMANN, F.G.; PROBST, C.M.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 483-488, 2008.

RABONI, S.M.; BORBA, L.; HOFFMANN, F.G.; DE NORONHA, L.; AZEVEDO, M.L. V.; CARSTENSEN, S.; MAZZAROTTO, G.A.C.A.; BORDIGNON, J.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case report. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, p. 153-156, 2009.

MOSIMANN A. L.P.; BORBA L.; BORDIGNON J.; MASON P.W.; DUARTE DOS SANTOS C.N. Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02). **Journal of Virological Methods**, v. 163, p. 147-152, 2010.



Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1

Ryosuke Suzuki^{a,b}, Luana de Borba^{a,c}, Claudia N. Duarte dos Santos^c, Peter W. Mason^{a,d,*}

^a Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, 3.206B Mary Moody Northen Pavilion, 301 University Boulevard, Galveston, TX 77555-0436, USA

^b Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640, Japan

^c Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), FIOCRUZ, Curitiba, Paraná, 81350-010, Brazil

^d Sealy Center for Vaccine Development, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555, USA

Received 11 October 2006; returned to author for revision 1 November 2006; accepted 16 November 2006

Available online 6 February 2007

Abstract

To help understand the mechanism of pathogenesis of dengue virus (DV), we set out to create an infectious cDNA of the Brazilian prototype strain of DV serotype 1 (DV1-BR/90). PCR-amplified fragments of DV1-BR/90 cDNA were readily assembled into a subgenomic cDNA that could be used to produce replicating RNAs (replicons), lacking the structural protein-encoding regions of the genome. However, assembly of a cDNA capable of producing infectious virus was only possible using a bacterial artificial chromosome plasmid, indicating that DV1 sequences were especially difficult to propagate in *E. coli*. While characterizing our cDNA we discovered a fortuitous temperature-sensitive mutation in the NS1 encoding region. Using our infectious cDNA and a renilla luciferase-expressing replicon we were able to demonstrate that this mutation produced a defect in RNA replication at 37 °C, demonstrating that the DV1 NS1 protein plays an essential role in RNA replication.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Dengue virus; Replicon; NS1; Temperature-sensitive mutant; Replication

Introduction

Dengue viruses (DV) are the etiologic agents of dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. The viruses are transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes. DV infections are a serious cause of morbidity and mortality in most tropical and subtropical areas of the world. Dengue cases are estimated to occur in up to 100 million individuals annually. DV belongs to the *Flavivirus* genus in the family *Flaviviridae* and there are four serotypes (DV1 to 4) (Burke and Monath, 2001). The four serotypes of DV do not confer cross-protective immunity, and epidemiological evidence indicates that immunity to one serotype of DV increases the chance of more severe

diseases upon infection with a second serotype by about ten-fold (Kurane and Ennis, 1997).

Flaviviruses are single-stranded, positive-sense RNA viruses that have an approximately 11-kb genome consisting of a single open reading frame encoding three structural proteins (C, preM/M and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5), with non-translated regions at its 5' and 3' terminal (5'UTR and 3'UTR). Flavivirus RNA replication occurs in the cytoplasm via a negative-strand intermediate, leading to the accumulation of positive-strand RNAs. Several NS proteins have been implicated in the process. The NS2B/NS3 serine proteinase is required for processing at multiple sites in the NS polypeptide. NS3 also possesses RNA triphosphatase and RNA helicase activities. NS5 contains methyltransferases and RNA-dependent RNA polymerase (Lindenbach and Rice, 2001).

NS1 is a highly conserved glycoprotein containing 12 invariant C residues and two potential N-linked glycosylation

* Corresponding author. Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, 3.206B Mary Moody Northen Pavilion, 301 University Boulevard, Galveston, TX 77555-0436, USA. Fax: +1 409 747 8150.

E-mail address: pwmason@utmb.edu (P.W. Mason).

sites. Although the functions of NS1 have not been fully elucidated, several lines of evidence suggest that NS1 is involved in viral RNA replication (Lindenbach and Rice, 1997; Mackenzie et al., 1996; Muylaert et al., 1997; Westaway et al., 1997).

Infectious clones have been obtained for multiple flaviviruses. The first systems, developed for yellow fever virus {YFV (Rice et al., 1989)} and DV4 (Lai et al., 1991), overcame the genetic instability of flaviviral genomes in standard *E. coli* plasmids by propagating the 5' and 3' halves of the genomes into separate fragments, followed by in vitro ligation of the fragments to produce a template for production of synthetic genome-length RNAs. Subsequent strategies that have been used to propagate genome-length cDNAs that could be used directly as templates for the production of infectious RNAs have included the use of yeast plasmids (Polo et al., 1997), low-copy plasmids (Gualano et al., 1998) or bacterial artificial chromosomes (BAC) plasmids (Van der Most et al., 1999) to overcome these *E. coli* instability problems.

Based on our successful strategy of using low-copy plasmids to propagate cDNAs for flavivirus replicons that were readily converted into genome-length clones for West Nile virus (WNV) (Rossi et al., 2005) and Japanese encephalitis virus (JEV) (Ishikawa, Konishi and Mason, unpublished), we designed a similar strategy to produce an infectious cDNA for DV1. Although our low-copy plasmid was suitable for DV1 replicon construction, we were unable to use this plasmid to produce an infectious genome-length DV1 cDNA. However, an

infectious cDNA was readily obtained in a BAC plasmid. Furthermore, while characterizing this cDNA we discovered a fortuitous mutation in NS1 that produced a temperature-sensitive (ts) form of the protein that permitted us to demonstrate the importance of NS1 in DV genome replication.

Results

Construction of cDNA encoding a replicon and an infectious DV1 RNA

Standard methods were used to create a subgenomic replicon from DV1-BR/90, the prototype strain of DV1 isolated in 1990 from a DF patient in Rio de Janeiro, Brazil. The viral RNA was extracted from infected C6/36 cells, reverse transcribed into cDNA and amplified in individual dsDNA fragments as shown in Fig. 1. The five individual fragments required to produce a replicon-length cDNA were readily assembled into the low-copy plasmid pACDV1poly. Synthetic RNAs produced from this plasmid (designated pACDV1repNS1*NS3*; see below) replicated well when introduced into BHK cells (see Fig. S1). Comparison of the sequence of this replicon and the PCR amplicons used to generate it revealed two changes in encoded amino acids, one in NS1 and a second in NS3 (see Table 1, discussed in detail below). Nevertheless, cells transfected with this replicon produced high levels of antigen when detected with either a polyclonal sera (results not shown) or a MAb to NS1 (Fig. S1).

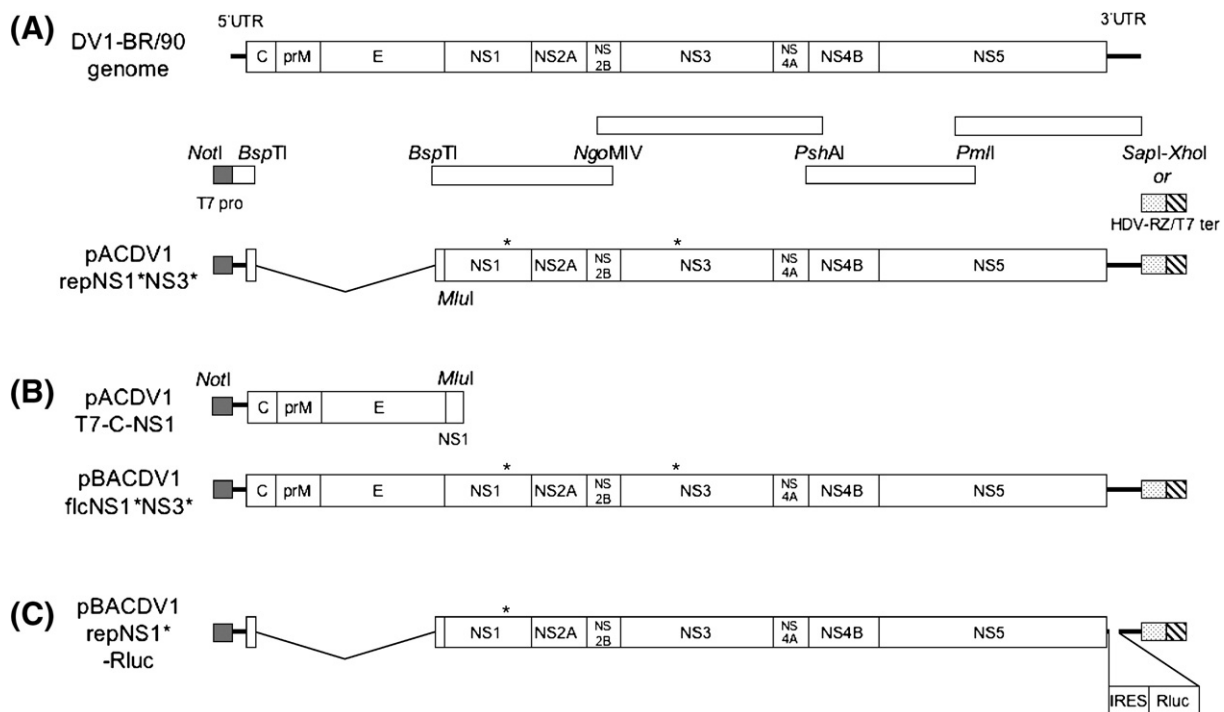


Fig. 1. (A) Schematic representation of the DV1-BR/90 genome showing the position of the restriction enzymes sites (*NotI*, *BspTI*, *NgoMIV*, *PshAI*, *PmlI*, *SapI*, *XhoI* and *MluI*) and fragments used to assemble the replicon cDNA encoded by pACDV1repNS1*NS3*. Position of the T7 promoter is shown on the left, and positions of the *SapI* and the HDV-RZ/bacteriophage T7 terminator fragments (which included a downstream *SwaI* site for linearization and an *XhoI* site for insertion) are shown at the right. (B) Schematic representation of the structural protein-encoding cDNA fragment present in pACDV1T7-C-NS1 and the cDNA present in BAC plasmid pBACDV1flcNS1*NS3*. (C) Structure and position of Rluc encoding cistron added to the 3' UTR of DV1repNS1*. The "*" above NS1 and NS3 are used to indicate the position of coding differences with the BR/90 amplicon (see Table 1 and text for details).

Table 1
Summary of nucleotide and amino acid sequence^a differences between the GenBank-deposited sequences of BR/90, the BR/90 amplicons used to generate our infectious cDNAs and various cloned cDNAs

Base position (codon) ^b	Coding region	BR/90 GenBank ^c	BR/90 amplicons	pACDV1rep NS1*NS3*	pACDV1 T7-C-NS1	pBACDV1flc NS1*NS3*	pBACDV1flc
325	C	A	G		G	G	G
1213	E	A	U		U	U	U
1258	E	U	C		C	C	C
1291	E	U	C		C	C	C
1378	E	A	G		G	G	G
1639	E	C	U		U	U	U
1648	E	U	C		C	C	C
2719	NS1	G	A	A		A	A
3159 (247)	NS1	A (Y) ^d	A (Y) ^d	G (C)		G (C)	A (Y) ^d
3265	NS1	C	U	U		U	U
3346	NS1	U	U	C		C	U
3424	NS1	C	U	U		U	U
3907 (144)	NS2A	C (H)	G (Q) ^d	G (Q) ^d		G (Q) ^d	G (Q) ^d
4627	NS3	G	A	A		A	A
5250 (211)	NS3	A (Q) ^d	A (Q) ^d	G (R)		G (R)	A (Q) ^d
5413	NS3	A	A	A		A	G
6148	NS3	U	U	C		C	C
6598	NS4A	A	A	G		G	G
10,195	NS5	G	G	A		A	A
10,258	NS5	A	A	G		G	G

^a Encoded amino acid sequences, when different, are shown in “()”.

^b Position of nucleotide change (within genome) and codon change (within the individual protein-encoding region).

^c AF226685.

^d Amino acid encoded at this position in all GenBank-deposited DV1 sequences examined (AY145121, AB178040, NC_001477, AY732483, AY726555, DQ193572, AB204803, AF311956, AF311957, AF311958, and AF513110) except for AF226685 (see text).

To construct a genome-length, infectious cDNA from pACDV1repNS1*NS3*, we created a low-copy plasmid encoding the 5'UTR and C-NS1 polyprotein of DV1-BR/90 (designated pACDV1T7-C-NS1; Fig. 1). Sequence analyses of pACDV1T7-C-NS1 confirmed that its sequence was identical to that in the DV1-BR/90 amplicons used to create it. Using multiple different restriction endonuclease assembly strategies, genome-length cDNAs were very difficult to assemble from pACDV1repNS1*NS3* and pACDV1T7-C-NS1. Furthermore, even when obtained, bacterial colonies harboring plasmids that had restriction maps consistent with full-length cDNAs grew very poorly. Moreover, when RNAs produced from the cDNA templates prepared from these bacteria were transfected into BHK cells, they failed to produce cells expressing any detectable DV1 antigen (results not shown). Since we successfully applied these same assembly methods to recover infectious cDNAs for WNV (Rossi et al., 2005) and JEV (Ishikawa, Konishi, and Mason, unpublished), these results suggested an especially severe genetic incompatibility/instability of full-length DV1 cDNAs in *E. coli* (see Introduction).

To overcome the apparent genetic instability/incompatibility of the DV1 cDNA sequences with our low-copy plasmid, we transferred the subgenomic replicon cDNA to a BAC plasmid and then added back the 5' end of the genome encoding the structural proteins from pACDV1T7-C-NS1 (see Fig. 1). Initial analyses demonstrated that synthetic RNAs from all three full-length BAC plasmid clones isolated from the first assembly attempt produced large numbers of antigen-positive cells (Fig. S2). One of these BAC plasmids, designated

pBACDV1flcNS1*NS3*, was sequenced in its entirety (see Table 1) and used for all further studies.

Characterization of DV1flcNS1*NS3*

BHK cells transfected with synthetic RNA produced from pBACDV1flcNS1*NS3* produced large numbers of antigen-positive cells when stained with antibodies specific for either E or NS1 (up to 50% of the cells in these cultures were antigen-positive 2 days after electroporation). However, the number of immunopositive cells in these cultures did not increase upon further cultivation, and infectious titer of DV in the supernatant fluid recovered from cells at all days up to and including day 8 post-electroporation was undetectable (Fig. S2 and results not shown). When C7/10 cells were electroporated with this RNA transcribed from this cDNA, a small number of immunopositive cells were detected on day 2, indicating that our electroporation methods were less efficient with mosquito cells than with BHK cells. However, by day 4, most of the cells in these transfected cultures were immunopositive, and by day 6, all cells stained strongly with DV-specific antibodies (Fig. 2). These results suggest that DV1 infection spread in these C7/10 cells, furthermore, titration of the supernatant fluid recovered from these electroporated cells revealed viral replication (approximately 4×10^3 focus-forming units (ffu)/ml on day 5 when titrated on C7/10 cells), indicating that pBACDV1flcNS1*NS3* was an infectious cDNA. However, the foci size of this virus, designated DV1flcNS1*NS3*, appeared smaller than parental DV1-BR/90 on C7/10, C6/36 and especially Vero cells (Fig. S3).

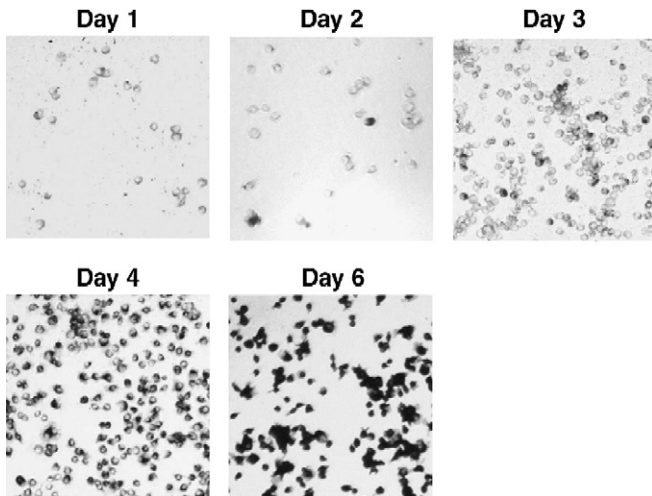


Fig. 2. Micrograph of monolayers of C7/10 cells electroporated with the *in vitro* transcript of pBACDV1flcNS1*NS3* and then fixed at the indicated time post-electroporation and stained with MAb D2-7E11.

Generation of repaired DV1 cDNA clones

To begin to dissect the reason of phenotypic difference between DV1flcNS1*NS3* and DV1-BR/90, a detailed comparison was made between the entire cDNA in pBACDV1flcNS1*NS3*, the RNA stock used to create it and various DV1 sequences (summarized in Table 1). These analyses confirmed that the assembly of the genomic fragments from the low-copy plasmids pACDV1repNS1*NS3* and pACDV1T7-C-NS1 into pBACDV1flcNS1*NS3* did not result in the selection of any nucleic acid differences, confirming the utility of the BAC plasmid in propagating the DV1 cDNAs. These analyses also confirmed that there were only 3 coding differences between the GenBank-deposited sequence of BR/90 (AF226685) and pBACDV1flcNS1*NS3*. Although a number of sequence differences appeared to be restricted to particular cloned fragments, it is unclear if the differences obtained in the *E. coli*-propagated cDNA fragments represented quasispecies in the viral RNA or a combination of PCR-introduced errors and *E. coli* selection (Table 1 and results not shown).

In the case of the three coding mutations, the NS2A position #144 difference between the GenBank-deposited sequence for DV1-BR/90 and our PCR amplicon was discounted from consideration since the Q encoded by our parental virus PCR amplicon and all of our cloned cDNAs (Fig. 1, Table 1 and results not shown) was shared by multiple other GenBank sequences for DV1 (see Table 1). The NS1 Y at position 247 and the NS3 Q at aa position 211 were present in our BR/90 amplicon, and all GenBank-deposited DV1 sequences examined (see above, and Table 1), but were altered in pBACDV1flcNS1*NS3*, and the low-copy plasmid-propagated cDNAs used to create it (Table 1). Furthermore, sequencing of several other low-copy plasmid clones of DV1-BR/90 cDNA spanning these regions demonstrated that it was possible to clone cDNA plasmids with the consensus sequence contained in the parental viral cDNA amplicon (results not shown), thus these two differences were

considered mutations associated with PCR amplification and/or cloning in low-copy plasmids.

To examine the role of the NS1 and NS3 mutations on the DV1flcNS1*NS3* phenotype, several additional infectious cDNAs were engineered with wild-type (WT) codons at one or both of these positions (Fig. 3). The infectivity of these full-length DV1 transcripts was tested in BHK and C7/10 cells. Cells were transfected with RNA transcripts by using Lipofectin and cultured for 4 days under a semi-solid overlay followed by immunostaining for DV1 antigen as shown in Fig. 3B. When RNAs were transfected into C7/10 cells, foci formation was observed in all clones, however, foci produced by RNAs obtained from pBACDV1flcNS1*NS3* and pBACDV1flNS3* were smaller than the foci produced from the cDNA plasmids encoding the WT NS3 Q, indicating that the R mutation in NS3 resulted in small foci size in C7/10 cells. In the case of transfected BHK cells, RNAs derived from clones with the WT NS1 sequences (pBACDV1flcNS3* and pBACDV1flc) produced foci (Fig. 3B), whereas RNAs from pBACDV1flcNS1*NS3* did not produce foci, and very small foci were observed with RNAs produced from pBACDV1flcNS1* (Fig. 3B). These results suggest that, although mutations in either NS1 or NS3 affected viral production in BHK cells, the NS1 mutation was the primary cause of defect of DV1 growth in these cells. As expected, side-by-side plaque assays of DV1flc and the parental virus on C7/10 cells and Vero cells showed indistinguishable plaque morphologies (Fig. 3C).

Phenotypic characterization of NS1 mutant

To further investigate the effect of the NS1 mutation on viral production from our infectious cDNAs, we compared the production of virus from cells infected with WT and NS1 mutant viruses at 30 °C or 37 °C. To this end, BHK cells were electroporated with transcribed RNA from pBACDV1flcNS1* or pBACDV1flc, diluted with naive BHK cells, and following attachment, the cell monolayers were cultured for 5 days under a semi-solid overlay and then immunostained to reveal DV1 foci. As shown in Fig. 4, foci morphology was similar for the progeny viruses derived from both pBACDV1flcNS1* or pBACDV1flc RNAs in BHK cells at 30 °C. However, in contrast, foci produced by RNA from pBACDV1flcNS1* were smaller than those produced by RNA from pBACDV1flc when these viruses were propagated in the cells at 37 °C (Fig. 4). To further explore the effect of temperature on the replication of DV1flcNS1*, side-by-side growth curves were generated with this virus and DV1flc in infected Vero cells grown at 30 °C and 37 °C (Fig. 5). These studies showed that at 30 °C, DV1flcNS1* replicated at similar levels to DV1flc. However, at 37 °C, DV1flcNS1* growth was delayed relative to DV1flc. Taken together, these results indicate that a C at codon 247 in NS1 produces a ts defect in NS1.

Effect of NS1 mutation on virus entry

Since NS1 is retained in the same cellular compartment as immature flavivirus provirions (Lindenbach and Rice, 2001), we reasoned that mutation 247 in NS1 could alter virus maturation and/or NS1 could be associated with the virion,

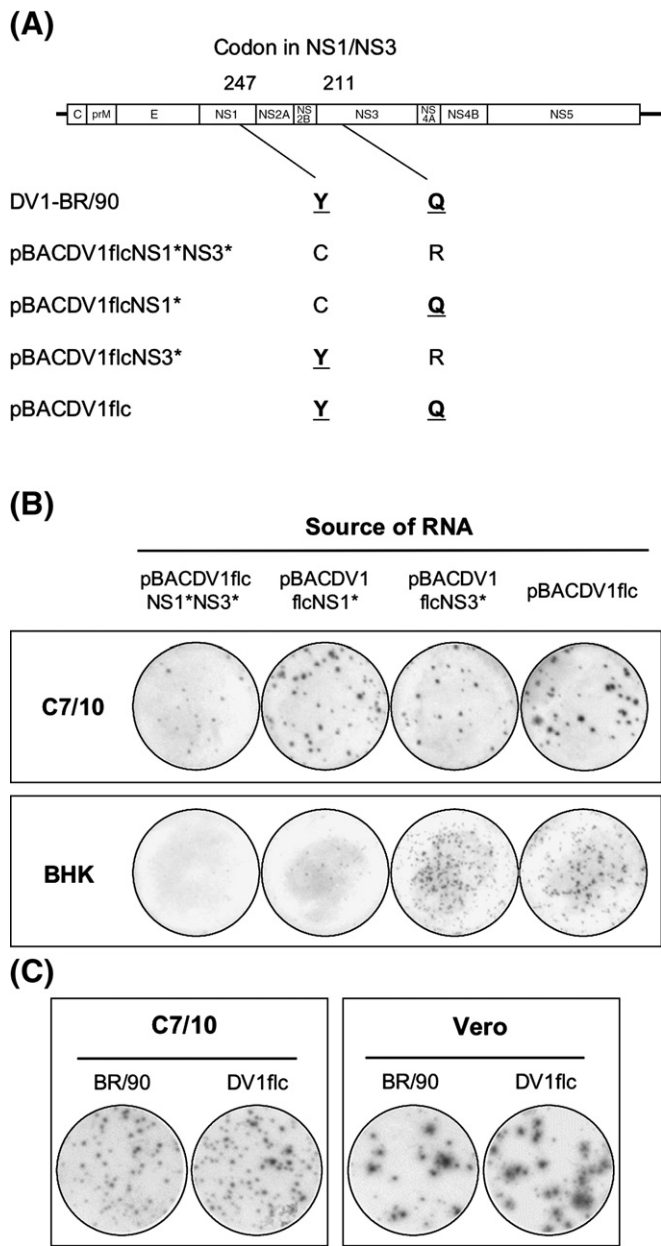


Fig. 3. Demonstration of the effect of NS1 and NS3 mutations on recombinant virus focus formation on monolayers of C7/10 and BHK cells. (A) Schematic representation of the genome of DV1 showing all of the amino acid coding differences between DV1-BR/90 and our BAC plasmid encoded genomes. The position of amino acid residues of NS1 and NS3 that differed between these genomes is shown at the top; bold type has been used to designate the amino acids of consensus sequence in DV1 (see text and Table 1). (B) Photographs of monolayers C7/10 and BHK cells transfected with Lipofectin using similar amounts of synthetic RNA (20 ng) from the indicated BAC clones, overlaid with semi-solid media and stained with anti-NS1 antibody 4 days after transfection. (C) Photographs of monolayers C7/10 and Vero infected with DV1-BR/90 or DV1flc, overlaid with semi-solid media and fixed and immunostained with anti-NS1 antibody 4 days (C7/10) or 5 days (Vero) after incubation at 30 °C (C7/10) or 37 °C (Vero).

altering virion infectivity. To determine if the NS1 247 ts mutation altered virion maturation and/or its infectivity at the non-permissive temperature, we performed a temperature shift experiment. In this assay, WT and mutant virus were incubated with Vero cells at 30 °C or 37 °C for 5 h (long enough to bind,

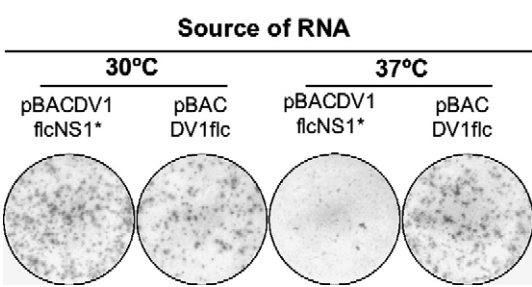


Fig. 4. Photographs of monolayers of cells transfected with synthetic RNA from pBACDV1flcNS1* and pBACDV1flc and then grown at 30 °C or 37 °C. BHK cells were electroporated with transcribed RNA from pBACDV1flcNS1* and pBACDV1flc, diluted with naive BHK cells, incubated for 5 days at indicated temperature then fixed and stained with MA b D2-7E11. In all cases, the same dilution (10-fold) of electroporated cells is shown.

penetrate and uncoat the genome of DV) and then incubated for 5 days at either of these temperatures. The results of this experiment, shown in Fig. 6, demonstrate that the NS1 mutation does not affect virus binding or establishment of replication since the WT and mutant viruses produce similar numbers of foci and similar-sized foci if the infection is conducted at 30 °C or 37 °C and then followed by a 5-day incubation at 30 °C. However, the number and size of foci produced by DV1flcNS1* were both drastically reduced when the post-entry phase of the experiment was performed at 37 °C (Fig. 6). These results suggest that this NS1 mutation has little (or no) effect on virus entry and uncoating and is likely to effect RNA genome replication and/or packaging and virion release.

Effect of NS1 ts mutation on RNA replication

To evaluate the role of the NS1 mutation in RNA replication, we developed a replicon of DV1 containing the renilla

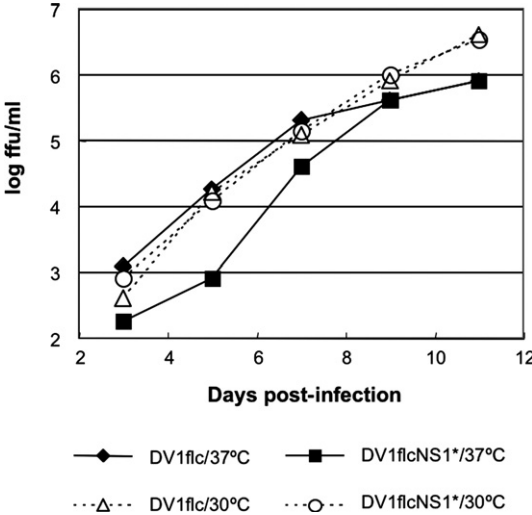


Fig. 5. Growth curves of DV1flcNS1* and DV1flc on Vero cells at 30 °C or 37 °C. Monolayers of Vero cells were infected with the indicated virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 and incubated at the indicated temperature. At each time point, the media were removed and frozen for subsequent titration and fresh media were added. Virus titers in cell culture medium were determined by plaque assay in Vero cells incubated at 30 °C.

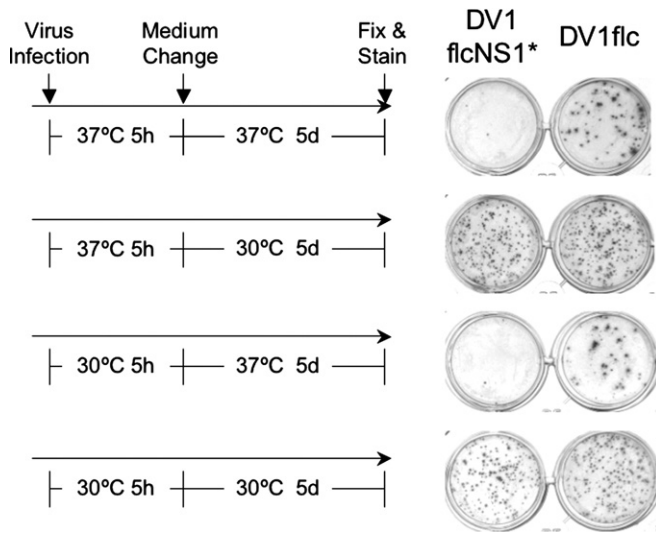


Fig. 6. Effect of temperature shift on infectious foci formation by cells infected with same numbers of ffu of DV1flcNS1* and DV1flc. The left side of the figure shows the incubation temperatures utilized for the 5-h attachment/infection and 5-day growth/spread portion (performed under semi-solid overlay) of the experiment, and the right side of the figure shows the resulting monolayers, fixed and stained with MAb D2-7E11 to reveal infectious foci (see Materials and methods).

luciferase (Rluc) reporter gene with or without the position 247 NS1 mutation (see Materials and methods and Fig. 1). These replicon RNAs were electroporated into BHK cells, and luciferase activities were measured at 6 h and 4 days post-electroporation. The values obtained 6 h after electroporation were nearly identical for both replicons at both temperatures, indicating that as expected the differences in NS1 position 247 had no effect on the initial translational activity of the reporter gene encoded by the transfected replicon RNA. For the later time point, these 6-h activities were used to normalize for transfection efficiency (see legend for Fig. 7). These Rluc data show that the

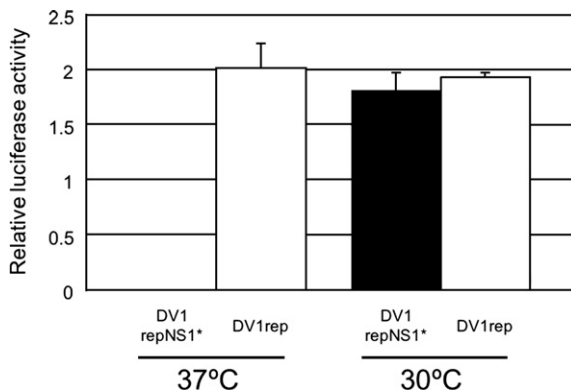


Fig. 7. Effect of NS1 mutation on DV1 RNA replication. BHK cells were electroporated with identical amount of Rluc-expressing DV1 subgenomic replicon RNAs (with or without the NS1 position 247 mutation), seeded in multi-well plates, and incubated at 30 °C or 37 °C prior to harvesting lysates for the determination of Rluc activity (see Materials and methods). Rluc activities were measured at 6 h and 4 days post-electroporation. The Rluc activity obtained at 4 days is shown normalized to the activity obtained at 6 h to account for slight differences in transfection efficiency (see text). Data from each condition are shown as an average of triplicate values with error bars showing standard deviations.

replicon harboring the NS1 mutation (DV1repNS1*) replicated much more poorly than the WT replicon at 37 °C (Fig. 7). In contrast, Rluc activities detected in lysates obtained from the same electroporations and then incubated at 30 °C contained indistinguishable levels of Rluc activity. These data indicate that the ts NS1 mutation reduces viral replication by reducing RNA replication.

Effect of NS1 mutation on polyprotein processing and NS1 secretion

To examine whether the ts mutation in NS1 affected processing and secretion of NS1 in infected cells, cells were infected with DV1flcNS1* or DV1flc for 5 days at 30 °C and then incubated for an additional 2 days at 37 °C. As shown in Fig. 8A, Western blot analyses revealed no obvious difference in the electrophoretic migration of NS1* versus NS1 or the amount of NS1 and NS1* present in cells at this time point. Furthermore, Western blot analyses of the NS1 present in the culture fluid harvested from these cells failed to reveal any gross defect in the dimerization or release of NS1* or NS1 from these cultures (Fig. 8B). Specifically, a heat-labile NS1 form matching the predicted dimer MW of 90 k was present in culture fluid harvested from cells infected with either DV1flcNS1* or DV1flc. Despite the lack of detectable differences in the quality of NS1 produced by DV1flcNS1* or DV1flc in cells grown at the non-permissive temperature for DV1flcNS1*, we did note a slight reduction in NS1* production from cells infected with the mutant virus, likely the result of the reduction in RNA replication detected with this virus when grown at this temperature (see above, and Fig. 7). Since the ts mutation consisted of the

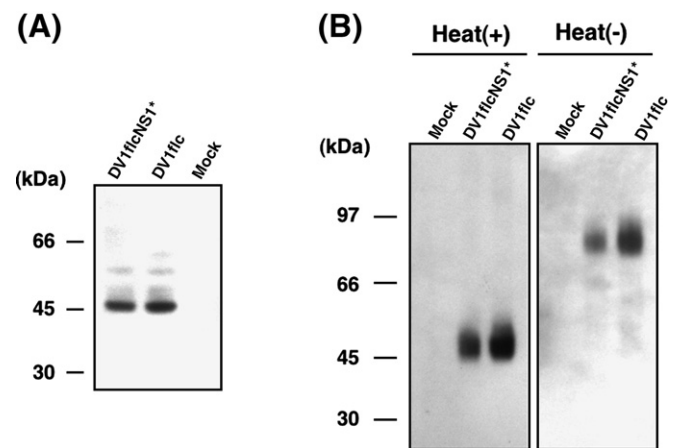


Fig. 8. Affect of NS1 mutation on NS1 synthesis and secretion. Western blots prepared from samples of cell lysates and supernatant fluids obtained from Vero cells infected at an MOI of 0.01 ffu with either DV1flcNS1* and DV1flc viruses (or mock-infected), incubated for 5 days at 30 °C (to allow both viruses to infect the entire monolayer) and then shifted to 37 °C for 2 days. The media were changed three times with serum free medium 1 day before harvest to insure that the NS1 protein analyzed represented protein produced at the final incubation temperature. (A) Replica of Western blot showing the NS1 protein (detected with MAb D2-7E11) present in cell lysates. (B) Replica of Western showing the NS1 protein released from the indicated cell monolayers at 37 °C, following electrophoresis after denaturation in the presence or absence (to preserve dimers) of heating, and detection with MAb D2-7E11.

addition of a C residue to NS1* that could have altered disulfide bond formation in NS1*, we compared the electrophoretic migration of non-reduced forms of NS1 and NS1* in lysates of cells prepared at the non-permissive temperature. These analyses failed to reveal any altered migration (specifically aggregation, associated with improper disulfide formation; (Lorenz et al., 2002); results not shown) suggesting that the ts mutation was not exerting its influence on RNA replication through a gross alteration in NS1 structure or intracellular localization.

Discussion

Infectious cDNAs have been reported for a large number of flaviviruses, including most of the important human pathogens. In some cases, the apparent incompatibility of full-length viral cDNAs with commonly used *E. coli* recombinant DNA propagation systems has hampered development of these important reagents. Here we have demonstrated the utility of a BAC plasmid system for propagation of a highly infectious cDNA from a South American strain of DV1. Specifically, the cDNAs propagated in BAC plasmids could be used as template for RNA transcription that generated highly infectious RNAs with a specific infectivity of more than 10^4 ffu/ μ g of RNA. BAC plasmids have been used by others to produce infectious cDNA clones for YFV (Van der Most et al., 1999), JEV (Yun et al., 2003) and DV2 (Pierro et al., 2006), but these investigators did not directly compare BAC plasmids to low-copy plasmids, which have been recently employed by several investigators to produce full-length clones of flaviviruses (see Introduction). In our hands, precisely the same low-copy plasmid methods that were used to successfully establish replicons and infectious cDNAs for WNV (Rossi et al., 2005) and JEV (Ishikawa, Konishi and Mason, unpublished) were successfully used to produce infectious DV1 replicons, but these methods were *not* able to be used to produce infectious full-length DV1 genomes. It is not clear the reason for the differences between these flaviviruses, but one possibility is that DV1 cDNAs or spontaneously produced translation products are more toxic to *E. coli* cells than the products produced from other flavivirus cDNAs.

The strain selected for our studies, DV1-BR/90, is a well-characterized South American prototype strain derived from an isolate obtained early after the introduction of DV1 to Brazil. We selected this strain due to the availability of animal-adapted derivatives (Duarte dos Santos et al., 2000) and the fact that DV1-BR/90 provides a useful starting point for comparisons to strains of DV1 that have evolved in Brazil since the introduction of DV1 to South America (Duarte dos Santos et al., 2002). Thus, this cDNA will be useful for understanding the involvement of animal-adapted and naturally evolved mutations in DV1 replication, transmission and pathogenesis.

The DV NS1 protein contains two N-linked glycosylation sites and 12 conserved C residues that have been shown to form 6 disulfides (Wallis et al., 2004). NS1 is secreted from mammalian, but not mosquito cells (Mason, 1989) and exists as a heat-labile homodimer (Winkler et al., 1988). Alteration of

selected C residues, or the N residues that are glycosylated during NS1 processing, results in the loss of dimerization and secretion of the NS1 protein, suggesting that dimerization is necessary for NS1 secretion (Pryor and Wright, 1993). However, cells infected with a Kunjin virus with a defect in NS1 dimer formation were able to secrete NS1, and the virus could replicate, suggesting that dimerization of NS1 is not an absolute requirement for NS1 secretion as well as NS1 function (Hall et al., 1999). Although a specific function of extracellular forms NS1 has not yet been demonstrated, NS1 has been shown to be important for replication of YFV. Specifically, mutations at the first or both N-linked glycosylation sites of YFV NS1 led to dramatic defects in RNA replication and virus production (Muylaert et al., 1996). Furthermore, a single amino acid substitution at position 299 in the YFV NS1 protein resulted in a defective for RNA accumulation and delayed viral production in a ts manner (Muylaert et al., 1997). Finally, trans-complementation studies revealed that NS1 has an important function at a very early stage in RNA replication (Lindenbach and Rice, 1997).

Our ts NS1 mutant virus, DV1flcNS1*, encodes an additional C residue between the naturally occurring C residues number 6 and 7. At the permissive temperature (30 °C), this virus is indistinguishable from the WT virus (DV1flc) in terms of growth and infectious focus formation. In addition, DV1flcNS1* appears to infect and uncoat with equal efficiency as the WT virus. However, DV1flcNS1* is retarded with respect to virion production at 37 °C. By using a subgenomic replicon encoding an Rluc reporter gene, we were able to demonstrate that the ts defect due to the additional C residue was manifest at the level of reduced RNA replication.

Examination of the processing of NS1* at the non-permissive temperature showed no obvious differences relative to WT NS1. Since the alteration in NS1* resulted in the substitution of an extra C residue for a Y residue, we specifically tested to see if this alteration was associated with changes in dimerization, secretion or misfolding, which could accompany the addition of an unnatural C, resulting in impaired disulfide bond formation. However, we were unable to detect any difference in synthesis, secretion or dimerization of NS1* when the ts mutant virus was grown at the non-permissive temperature (37 °C). These results suggest that the Y residue at position 247 in NS1, which is highly conserved in all DV1 examined (Table 1), might be important for function of NS1. Interestingly, a P to L substitution at residue 250 in Kunjin virus NS1 also produced a mutant virus with delayed replication (Hall et al., 1999), and an R to A mutation at residue 299 in YFV NS1 was also responsible for a ts RNA synthesis phenotype (Muylaert et al., 1997), indicating that this C-terminal region of NS1 plays a critical role in RNA replication for multiple flaviviruses.

The NS1* mutation resulted in a significant delay in virus production at the non-permissive temperature during first 5 days of DV1flcNS1* infection in Vero cells, consistent with a role for NS1 in the early phases of viral RNA replication. However, DV1flcNS1* titers were indistinguishable from DV1flc titers at 9 days post-infection, suggesting that later stages of virus

replication were less affected by this mutation. Interestingly, the ts mutation in NS1* appeared to be relatively stable since we were unable to detect revertants following attempts to grow the virus at 37 °C.

The mutation that we detected in DV1fcNS1* reduces virus yield at 37 °C, suggesting that it could attenuate viremia in vivo, a property that is correlated with disease severity in man (Murgue et al., 2000; Vaughn et al., 2000). Thus, our NS1* mutation (or alternative mutations in the C-terminal region of NS1) might be a useful additions to live-attenuated vaccine candidates for dengue.

In summary, our work on an infectious cDNA system for DV1 has demonstrated the advantage of the BAC plasmid over a widely utilized low-copy plasmid and has identified a novel ts mutation in NS1 that has been used to demonstrate a role for NS1 in DV RNA synthesis.

Materials and methods

Plasmids, viruses and cell lines

A low-copy plasmid, designated pACDV1poly, was derived from pACNR (Ruggli et al., 1996) by adding a custom polylinker containing *NotI*, *BspTI*, *BspEI*, *NgoMIV*, *PshAI*, *PmlI* and *XhoI* restriction endonuclease sites to facilitate cloning of DV1 cDNA fragments. A BAC plasmid designated pBACDV1poly was derived from pBeloBAC11 (a BAC plasmid containing the Ori2 origin of replication and F (fertility) factor of *E. coli* (Shizuya et al., 1992); obtained from I. Frolov) by removal of a non-essential *NotI* fragment and substitution of a directional polylinker containing a *NotI*, *BamHI*, *XhoI* and *SwaI* restriction endonuclease sites to facilitate directional insertion of DV1 cDNAs fragments cloned into low-copy plasmids.

DV1-BR/90, a Brazilian DV1 strain isolated from an adult male with DF in Rio de Janeiro, RJ, Brazil, in 1990 has been previously described (Despres et al., 1993; Nogueira et al., 1993). This isolate was obtained from P. Despres (Interactions Moléculaires Flavivirus-Hôtes, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724, Paris, cedex 15, France) and then was passaged an additional 4 times in C6/36 cells, prior to use. Virus stocks were maintained at –80 °C.

BHK cells were maintained at 37 °C in minimal essential medium (MEM—Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS—Gemini) and antibiotics. Vero cells were maintained at 37 °C in MEM containing 6% FBS and antibiotics. C7/10 and C6/36 mosquito cell lines were maintained at 30 °C in Leibovitz's L15 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS, 10% tryptose phosphate broth (Sigma) and antibiotics.

cDNA synthesis, amplification and cloning

Total cellular RNA was extracted from BR/90-infected C6/36 cells using RNAqueous (Ambion). DV1 RNA present in this preparation was reverse-transcribed using random hex oligonucleotide primers and Improm-II reverse transcriptase (Pro-

mega). Fragments of DV1-BR/90 cDNA were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using specific oligonucleotide primers (see Fig. 1) and a high-fidelity Taq polymerase (Sigma). The resulting double-stranded cDNA fragments were resolved by gel electrophoresis, purified by standard methods (Qiagen), digested with restriction endonucleases and cloned into pACDV1poly (see Fig. 1). The oligonucleotide used to amplify the 5'UTR included a T7 promoter recognition site and an additional G preceding the first base of the viral genome. In addition, a synthetic antisense oligonucleotide was used to add a *BspTI* site at codons 30–31 of the C-coding region (following the cyclization sequence), and a sense oligonucleotide was designed that added the same site preceding the final transmembrane domain of the E protein coding sequence to permit the ligation of C to NS1, permitting the construction of a subgenomic replicon (Fig. 1). Finally, two alternative strategies were designed to create synthetic run-off transcripts that contained a 3' terminus identical to the viral RNA. The first consisted the introduction of a type IIS restriction endonuclease site (*SapI*) downstream of the 3' end of the cDNA by using an antisense oligo containing an *XhoI* site and the *SapI* site fused to the complement of the 3' end of the DV1 genome (CCGCTCGAGGCTCTTCGAGAACCTGTTGATTCAA-CAGC). The second strategy consisted of using oligonucleotides to fuse a hepatitis delta virus ribozyme (HDV-RZ)/bacteriophage T7 terminator fragment (Mason et al., 2002) to the 3' end of the cDNA using an overlap PCR construction strategy (Higuchi et al., 1988). PCR-generated cDNA fragments were individually inserted into pACDV1poly (in some cases by a multiple step-wise addition process recreating the natural junctions) and the resulting molecularly cloned plasmids were isolated by standard techniques and sequences were checked by automatic nucleotide sequencing and compared to the sequence of PCR amplicons obtained from mosquito cells infected with DV1-BR/90 and the original DV1-BR/90 sequence deposited with GenBank (AF226685). Fragments were assembled into genome-length cDNAs in the pACDV1poly and pBACDV1poly by standard methods (see Fig. 1).

To construct subgenomic DV1 replicons expressing a humanized Rluc reporter, overlap PCR (Higuchi et al., 1988) was used to fuse an EMCV IRES to a humanized Rluc gene derived from pGL4.73 (Promega), and this cassette was inserted into the variable region of the 3'-UTR (in place of bases –447 to –279 from the last base in the DV1 genome in pBACDV1rep and related plasmids (see Fig. 1)).

RNA synthesis using in vitro transcription reactions

Plasmids were purified by centrifugation in CsCl gradients using standard methods. Plasmids were prepared for run-off transcription by digestion with *SapI* restriction endonucleases or *SwaI* (in the case of HDV-RZ-encoding plasmids), and the resulting template DNAs were in vitro transcribed using MegaScript T7 synthesis kit (Ambion) supplemented with a 7mG(ppp)G cap analogue (NEB). This 7mG(ppG) cap analogue was added to permit efficient capping of this synthetic transcript, which was designed to encode an unnatural G in front

of the normal DV A residue in order to facilitate high level synthesis with phage T7 polymerase (which produces much higher levels of RNA from transcripts beginning with a G). The yield and integrity of transcripts were analyzed by gel electrophoresis under nondenaturing condition, and aliquots of transcription reactions were used for transfection without additional purification.

RNA transfection

RNA was transfected into BHK or C7/10 monolayers using Lipofectin (Invitrogen) by a slight modification of the manufacturer's suggested protocol. Three hours after transfection, the RNA/Lipofectin/media was removed from the cell layer and the cells were re-fed with growth media and incubated at 30 or 37 °C, as required. BHK or C7/10 cells were electroporated with T7 transcription reactions as previously described (Rossi et al., 2005).

Detection of DV-antigen in transfected cells by immunohistochemical staining

DV1 antigen expressing cells were labeled by a modification of previously described methods (Rossi et al., 2005). Briefly, cell monolayers were rinsed with PBS, fixed in cold acetone/methanol (1:1), air-dried, rehydrated with PBS containing 1% normal horse serum (NHS; Sigma) and incubated with DV-specific antibodies (polyclonal hyperimmune murine ascitic fluid (HIMAF) from DV1-infected mice (supplied by R.B. Tesh), an E-specific monoclonal antibody (Mab) D1-4G2 (Gentry et al., 1982) (supplied by R.B. Tesh) or the NS1-specific Mab D2-7E11 (Mason et al., 1990) (provided by J.R. Putnak, WRAIR, Washington DC)) followed by a peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (KPL), and peroxidase-labeled cells were stained with the VIP substrate (Vector Laboratories).

Western blot analysis

Proteins present in cell culture fluid or obtained from triton-lysed monolayers (lysed in 0.1% triton X-100, 300 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6) of infected cells were resolved by SDS-PAGE (NuPAGE; Invitrogen) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon). After blocking, these membranes were probed with Mab D2-7E11 (anti-NS1) and then washed and incubated with a peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (KPL). The decorated NS1 proteins were then detected with the ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) and the image was captured on X-ray film.

Viral titrations and growth curves

Cell monolayers prepared in multi-well plates were incubated with dilutions of virus and then overlaid with growth media (in some cases containing 0.8% carboxymethyl cellulose (CMC; Sigma, medium viscosity)) and incubated for the

indicated times and then fixed and immunostained as described above, and foci were counted and used to calculate a titer of ffu/ml. For growth curves, Vero cells were infected and then incubated at the indicated temperature and at selected intervals the media was removed for storage at –80 °C (for subsequent titration) and replaced with fresh media.

Renilla luciferase assay

Monolayers of BHK cells electroporated with Rluc-expressing plasmids were lysed by addition of Reporter Lysis Buffer (Promega), and the lysates were stored at –20 °C for subsequent assay. Prior to assay, the extracts were thawed and clarified to remove insoluble debris, and a portion of each extract was mixed with 5 volumes of an Rluc reaction buffer (100 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.0, containing 5 µg/ml Coelenterazine; Nanolight technology) in black-walled 96-well microtitration plates. Following a 1 min incubation period, luminescence was determined using a Microplate Luminometer (Applied Biosystems).

Acknowledgments

We thank Dr. J.R. Putnak, WRAIR, Washington, DC for providing the anti-NS1 Mab, and Dr. R.B. Tesh of UTMB for providing the polyclonal anti-DV1 HIMAF, and hybridoma cells producing the E-specific Mab, D1-4G2, and I. Frolov for supplying pBeloBAC11. We also thank I. Frolov and D. Beasley for helpful discussion and suggestions. This work was supported by a grant from NIAID to PWM through the Western Regional Center of Excellence for Biodefense and Emerging Infectious Disease Research (NIH grant number U54 AI057156). We also acknowledge Fundacao Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and Conselho de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for their support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.virol.2006.11.026](https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.026).

References

- Burke, D.S., Monath, T.P., 2001. Flaviviruses, Fourth ed. In: Roizman, B. (Ed.), Fields Virology, vol. 1. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1043–1125.
- Despres, P., Frenkiel, M.P., Deubel, V., 1993. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196, 209–219.
- Duarte dos Santos, C.N., Frenkiel, M.P., Courageot, M.P., Rocha, C.F.S., Vazeille, F.M.C., Wien, M.W., Rey, F.A., Deubel, V., Despres, P., 2000. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology* 274, 292–308.
- Duarte dos Santos, C.N., Rocha, C.F., Cordeiro, M., Fragoso, S.P., Rey, F., Deubel, V., Despres, P., 2002. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res.* 90, 197–205.

- Gentry, M.K., Henchal, E.A., McCown, J.M., Brandt, W.E., Dalrymple, J.M., 1982. Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 548–555.
- Gualano, R.C., Pryor, M.J., Cauchi, M.R., Wright, P.J., Davidson, A.D., 1998. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. *J. Gen. Virol.* 79, 437–446.
- Hall, R.A., Khromykh, A.A., Mackenzie, J.M., Scherret, J.H., Khromykh, T.I., Mackenzie, J.S., 1999. Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. *Virology* 264, 66–75.
- Higuchi, R., Krummel, B., Saiki, R.K., 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16, 7351–7367.
- Kurane, I., Ennis, F.A., 1997. Immunopathogenesis of dengue virus infections. In: Gubler, D.J., Kuno, G. (Eds.), *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 273–290.
- Lai, C.J., Zhao, B.T., Hori, H., Bray, M., 1991. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5139–5143.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 1997. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J. Virol.* 71, 9608–9617.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2001. *Flaviviridae: the viruses and their replication*, Fourth ed. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.G., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 991–1041.
- Lorenz, I.C., Allison, S.L., Heinz, F.X., Helenius, A., 2002. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 76, 5480–5491.
- Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Young, P.R., 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220, 232–240.
- Mason, P.W., 1989. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 169, 354–364.
- Mason, P.W., Zugel, M.U., Semproni, A.R., Fournier, M.J., Mason, T.L., 1990. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* 71, 2107–2114.
- Mason, P.W., Bezborodova, S.V., Henry, T.M., 2002. Identification and characterization of a *cis*-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 76, 9686–9694.
- Murgue, B., Roche, C., Chungue, E., Deparis, X., 2000. Prospective study of the duration and magnitude of viraemia in children hospitalised during the 1996–1997 dengue-2 outbreak in French Polynesia. *J. Med. Virol.* 60, 432–438.
- Muylaert, I.R., Chambers, T.J., Galler, R., Rice, C.M., 1996. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology* 222, 159–168.
- Muylaert, I.R., Galler, R., Rice, C.M., 1997. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. *J. Virol.* 71, 291–298.
- Nogueira, R.M., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Souza, R.W., Zagne, S.M., Schatzmayr, H.G., 1993. Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. *Epidemiol. Infect.* 111, 163–170.
- Pierro, D.J., Salazar, M.I., Beaty, B.J., Olson, K.E., 2006. Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. *J. Gen. Virol.* 87, 2263–2268.
- Polo, S., Ketner, G., Levis, R., Falgout, B., 1997. Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast. *J. Virol.* 71, 5366–5374.
- Pryor, M.J., Wright, P.J., 1993. The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology* 194, 769–780.
- Rice, C.M., Grakoui, A., Galler, R., Chambers, T.J., 1989. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. *New Biol.* 1, 285–296.
- Rossi, S.L., Zhao, Q., O'Donnell V. K., Mason, P.W., 2005. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. *Virology* 331, 457–470.
- Ruggli, N., Tratschin, J.D., Mittelholzer, C., Hofmann, M.A., 1996. Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J. Virol.* 70, 3478–3487.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M., 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8794–8797.
- van der Most, R.G., Corver, J., Strauss, J.H., 1999. Mutagenesis of the RGD motif in the yellow fever virus 17D envelope protein. *Virology* 265, 83–95.
- Vaughn, D.W., Green, S., Kalayanaraj, S., Innis, B.L., Nimmannitya, S., Suntayakorn, S., Endy, T.P., Raengsakulrach, B., Rothman, A.L., Ennis, F. A., Nisalak, A., 2000. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* 181, 2–9.
- Wallis, T.P., Huang, C.Y., Nimkar, S.B., Young, P.R., Gorman, J.J., 2004. Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. *J. Biol. Chem.* 279, 20729–20741.
- Westaway, E.G., Mackenzie, J.M., Kenney, M.T., Jones, M.K., Khromykh, A. A., 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J. Virol.* 71, 6650–6661.
- Winkler, G., Randolph, V.B., Cleaves, G.R., Ryan, T.E., Stollar, V., 1988. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* 162, 187–196.
- Yun, S.I., Kim, S.Y., Rice, C.M., Lee, Y.M., 2003. Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 77, 6450–6465.

Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics

Meri Bordignon Nogueira/^{1/2}, Vanessa Stella, Juliano Bordignon, Weber Cheli Batista³, Luana de Borba, Luis Hildebrando Pereira da Silva³, Federico Guillermo Hoffmann, Christian Macagnan Probst, Claudia Nunes Duarte dos Santos/⁺

Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Rua Prof. Algacyr Munhoz Maeder 3.775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, PR, Brasil ¹Departamento de Patologia Médica ²Laboratório de Virologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil ³Unidade de Virologia, Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais, Porto Velho, RO, Brasil

The reintroduction of dengue virus type 3 (DENV-3) in Brazil in 2000 and its subsequent spread throughout the country was associated with genotype III viruses, the only DENV-3 genotype isolated in Brazil prior to 2002. We report here the co-circulation of two different DENV-3 genotypes in patients living in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. Complete genomic sequences of viral RNA were determined from these epidemics, and viruses belonging to genotypes V (Southeast Asia/South Pacific) and III were identified. This recent co-circulation of different DENV-3 genotypes in South America may have implications for pathological and epidemiological dynamics.

Key words: dengue virus type 3 - genotype III and V - co-circulation - phylogenetic analysis - Amazon

Dengue is an emerging infectious disease affecting almost 50 million people in tropical and subtropical regions of the world. Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) are caused by four closely related, but antigenically different dengue virus serotypes 1-4 (DENV-1-4) (Gubler & Clark 1995). Since the introduction of the DENV into Brazil in 1986, more than four million cases of dengue have been reported (Cordeiro et al. 2007), and the incidence of severe clinical symptoms has increased. No vaccine or specific therapeutic antiviral measures are available.

Several studies have suggested that individuals experiencing a second dengue infection with a heterologous serotype are at greater risk for developing DHF or dengue shock syndrome (DSS) (Cummings et al. 2005, Halstead et al. 2005). However, DHF and DSS are also observed in primary cases, and not all secondary infections correspond to severe forms of the disease. Studies based on molecular epidemiology have provided evidence that differences in virulence between viral strains could play a role in the severity of the disease (Mangada & Igarashi 1998, Rico-Hesse 2003).

Major dengue virus epidemics occurred in Brazil in 1986 and 1990, due to the introduction of DENV-1 and -2, respectively, and the subsequent spread of these serotypes throughout the country. DENV-3 reappeared in 1994 in Central America (Nicaragua and Panama) after 17 years of absence, and later spread to Mexico and the Caribbean (CDC 1995, Guzman et al. 1996, Usuku et al. 2001). In 2000, the presence of this serotype was re-

ported in two countries in South America: Brazil and Venezuela (Nogueira et al. 2001, Uzcategui et al. 2003). DENV-3 was initially isolated in December 2000 in the state of Rio de Janeiro (RJ), in Southeastern Brazil (Nogueira et al. 2005). The virus has since been detected in almost all Brazilian states, establishing conditions of hyperendemicity with serotypes 1, 2 and 3. DENV-3 genotype III (Sri Lanka/India) was identified in all affected states during the epidemics of 2001 to 2004, and caused the one of most severe epidemic with the largest number of reported cases, greatest severity of clinical manifestations in primary infections in particular, and the largest number of confirmed deaths (Nogueira et al. 2005). In 2002, Brazil contained almost 80% of the one million cases of dengue infection in the Americas, with almost 800,000 dengue cases and 150 deaths attributed to DENV-3 (www.saude.gov.br). Recently, Figueiredo et al. (2008) reported the circulation of DENV-3 genotype I in Minas Gerais.

In the Amazonian state of Rondônia (RO), located in the Northern region of Brazil, the first confirmed cases of dengue dated from 1997, and the first outbreak occurred in 2000, with 2,759 cases (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_dengue2007.pdf). DENV-1 was isolated in 2001 in Porto Velho (the largest city in the state). In 2002, following the introduction of DENV-3, the state experienced an epidemic, in which unusual clinical symptoms, such as meningoencephalitis, were observed (Nogueira et al. 2005, WC Batista, unpublished observations). Given the high incidence of severe clinical symptoms related to primary DENV infections observed in the 2002 epidemic, we decided to characterize the genome of the virus circulating in the Northern region of Brazil and determine its phylogenetic relationship with other DENV-3 strains. Identification of the circulating DENV genotypes is important, as it has been demonstrated that some strains are more frequently associated with severe disease than others (Leitmeyer et al. 1999, Pandey & Igarashi 2000, Rico-Hesse 2003).

Financial support: Fiocruz, CNPq (proc. 410593/2006-0), Fundação Araucária (proc. 5-1-8892), CYTED/RIVE network

+ Corresponding author: clsantos@tecpar.br; clsantos@fiocruz.br

Received 11 March 2008

Accepted 4 July 2008

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Clinical samples and viruses - A serum sample from a dengue positive patient who had traveled to an area of epidemic dengue in RJ in Southeastern Brazil, and eight serum samples from patients living in Acre (AC) and RO in Northern Brazil (Table I, Fig. 1) were kindly provided by LACEN, Curitiba and IPEPATRO, Porto Velho, respectively. All patients were diagnosed with DF. These samples were used for the characterization of DENV genomes.

RNA extraction and RT-PCR - Viral RNA was isolated from 140 µl of patient serum samples, taken during the acute phase of the disease and/or from 140 µl of purified virus prepared from cell culture supernatants after three passages in C6/36 cells, as described elsewhere (Duarte dos Santos et al. 2002). The QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA) was used, following the manufacturer's instructions. Complete genomes were amplified by means of overlapping RT-PCR products, using 5 µl of RNA and random primers (Invitrogen, Carlsbad, USA) and Improm II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA), for 1 h at 47 °C; 5 µl of cDNA were used for the amplification reaction with the High Fidelity Triple-Master® PCR System (Eppendorf, Hamburg, Germany) and specific primers, according to the protocols supplied with the kit. Briefly, the thermocycling conditions consisted of 94°C/3 min, followed by 35 cycles of 94°C/30 s, 55-58°C/30 s and 68°C/3 min.

Sequencing strategy, multiple sequence alignment and phylogenetic analysis - The amplicons were directly sequenced using a Thermo Sequenase kit (USB Inc, Ohio, USA) on an ABI3100 device, with the Big-Dye7 Terminator method (Applied Biosystems, Warrington, UK). Nucleotide sequences were analyzed with a Phred/Phrap/Consed package (www.phrap.org). Sequences were obtained from the 5' and 3' UTR of the BR DEN3/290-02, BR DEN3/95-04, BR DEN3/97-04, BR DEN3/98-04, BR DEN3/RO1-02 and BR DEN3/RO2-02 samples after uncapping and RNA ligation, as described elsewhere (Duarte dos Santos et al. 2000). Primer sequences are available upon request.



Fig. 1: map of Brazil, showing the areas from which DENV-3 viruses were isolated (*) and the borders of the countries of South America.

Sequence analyses - For phylogenetic and comparative purposes, we assembled a representative panel of complete DENV-3 genome sequences from GenBank (supplementary data). All sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson et al. 1994). Phylogenies were estimated in a Maximum likelihood framework using Treefinder (version April, Jobb et al. 2004). We selected the best-fit model of nucleotide substitution based on the

TABLE I
Patient code, GeneBank accession number, origin, data, nucleotide sequence and genotype

Patient	GeneBank	State of origin/city	Month/year	Genome sequence/nt	DENV-3 Genotype
BR DEN3/290-02	EF629369	RJ/Rio de Janeiro	01/2002	Complete/10707	III
BR DEN3/95-04	EF629366	AC/Rio Branco	11/2004	Complete/10707	III
BR DEN3/97-04	EF629367	AC/Rio Branco	11/2004	Complete/10707	III
BR DEN3/98-04	EF629368	AC/Rio Branco	11/2004	Complete/10707	III
BR DEN3/RO1-02	EF629370	RO/Porto Velho	11/2002	Complete/10696	V
BR DEN3/RO2-02	EF629373	RO/Porto Velho	03/2002	Partial/10324	V
BR DEN3/RO3-02	1810-3470 (EF629375) 4300-5500 (EF629374) 6010-10220(EF629376)	RO/Porto Velho	02/2002	Partial/7070 ^a	V
BR DEN3/RO4-02	EF629371	RO/Porto Velho	08/2002	Partial/367 ^b	V
BR DEN3/RO5-02	EF629372	RO/Porto Velho	11/2002	Partial/227 ^b	V

a: 1810-3470 (genes E and NS1), 4300-5500 (genes NS2B and NS3), 6010-10220 (genes NS3, NS4A, NS4B and NS5); *b*: gene C; AC: Acre; RJ: Rio de Janeiro; RO: Rondônia.

Bayesian Information Criterion using the Model Proposal routine from Treefinder. Support for the nodes was evaluated by running 500 bootstrap pseudoreplicates. The likelihood scores of competing hypotheses were obtained using the Shimodaira-Hasegawa (SH) topology test (Shimodaira & Hasegawa 1999), as implemented in Treefinder (Jobb et al. 2004).

RESULTS

In order to characterize the DENV strains circulating in Brazil and determine their relationships with other DENV strains, we examined clinical samples from RO (epidemic in 2002) and AC (epidemic in 2004), and from RJ (epidemic in 2002), located in the Northern and Southeastern regions of Brazil, respectively. Nine DENV isolated from human samples collected in these three different geographical areas of Brazil were sequenced after three passages in C6/36 cells. Complete genome sequences were determined for five of these viral isolates: BR DEN3/290-02, BR DEN3/95-04, BR DEN3/97-04, BR DEN3/98-04 (alignment of 10707 nt) and BR DEN3/RO1-02 (alignment of 10696 nt). In addition, an almost complete genome sequence of the BR DEN3/RO2-02 virus (starting at position 378 and ending at position 10696), as well as three fragments covering ~70% of the genome from the BR DEN3/RO3-02 strain (corresponding to positions 1810-3470, 4300-5500 and 6010-10220) were determined. The BR DEN3/RO1-02 and BR DEN3/RO2-02 sequences had an 11 bp deletion in the 3'UTR. We also determined partial genomic sequences from viral RNA extracted directly from the plasma of two Rondônia patients (BR DEN3/RO5-02, from nt 135 to 361 and BR DEN3/RO4-02, from nt 132 to 498 of DENV-3 RNA). Both samples were identified as belonging to genotype V. We compared complete genomic sequences between five dengue viruses and 7070 nt between seven dengue viruses (due mainly to the fragmentation of BR DEN3/RO3-02). Their nucleotide and amino acid similarities are displayed in Table II.

Comparisons of complete genome nucleotide sequences showed that BR DEN3/290-02 was most similar to BR74886/02 (99.6% identity, AY679147), which was isolated from the liver of a patient who died from the disease in RJ (Miagostovich et al. 2002, 2006). BR DEN3/RO1-02 was found to be closely related to 80-2 (99.7% identity, AF317645), a virus from a DF patient isolated in 1980 in China. As can be seen in Fig. 2, the samples from

RO formed a separate cluster, which was closely related to the DENV-3 H-87 (M93130), D3-73NIID (AB111085) and 80-2 (AF317645) isolates, which belong to genotype V (Southeast Asia/South Pacific), and are clearly different from those from AC and RJ isolates, which clustered with genotype III (Sri Lanka/India, AY099336). This finding is remarkable, as the three genotype V viruses were isolated in Asia in 1956, 1973 and 1980, respectively.

Brazilian DENV-3 isolates grouped into two separate clades: all samples isolated from Acre grouped with an isolate from RJ, whereas all samples isolated from RO were clustered in a separate clade (Fig. 2). Bootstrap support for nodes separating the two groups of Brazilian samples was strong (Fig. 2), and a tree where all sequences from Brazil were clustered in a single group providing significantly worse fit to the data (SH test $p < 0.001$).

DISCUSSION

A displacement of serotypes 1 and 2 of DENV was documented in Brazil after the introduction of a highly virulent genotype of DENV-3 (genotype III, Sri Lanka/India) in 2002 (Nogueira et al. 2005). The rapid spread of DENV-3 caused severe epidemics in almost all Brazilian regions in the three years following its introduction (Nogueira et al. 2005, De Simone et al. 2004). The Northern region of Brazil suffered DENV-3 epidemics between 2002 and 2004. Different clinical profiles were observed during this epidemic period, with DHF/DSS and encephalitis cases identified in RO, whereas only DF was observed in AC. During the DENV-3 epidemic in RO in 2002, several atypical encephalitis cases were observed in patients testing positive serologically for dengue, but it was not possible to isolate virus from those patients. It remains unclear whether that clinical pattern was exclusively related to DENV-3, or was the result of co-infection with other viruses, such as the SLE or Rocio viruses (Rocco et al. 2005, Mondini et al. 2007). However, we cannot exclude the possibility that the observed unusual clinical presentations were exclusively due to the DENV infections, taking into account the results of Domingues et al. (2008) which showed that 21.2% of patients with dengue infection exhibited involvement of the central nervous system. In AC, DENV-3 was first isolated in 2004 and no severe case was observed at that time (Brazilian Ministry of Health, SVS, www.saude.gov.br).

We compared viral genomes amplified directly from serum samples or from insect cells infected with viruses

TABLE II
Nucleotide (bottom) and amino acid (top) similarity between Brazilian dengue virus type 3 (BR DEN3) isolates described in this paper

	DEN3/95-04	DEN3/98-04	DEN3/290-02	DEN3/97-04	DEN3/RO2-02	DEN3/RO1-02	DEN3/RO3-02
DEN3/95-04		99.9	99.9	99.6	98.1	98.1	98.1
DEN3/98-04	99.9		99.8	99.6	98.1	98.1	98.1
DEN3/290-02	99.6	99.6		99.7	98.1	98.1	98.1
DEN3/97-04	99.4	99.4	99.5		97.9	97.9	97.9
DEN3/RO2-02	94.5	94.5	94.5	94.4		100.0	100.0
DEN3/RO1-02	94.5	94.5	94.5	94.4	100.0		100.0
DEN3/RO3-02	94.5	94.5	94.5	94.4	100.0	100.0	

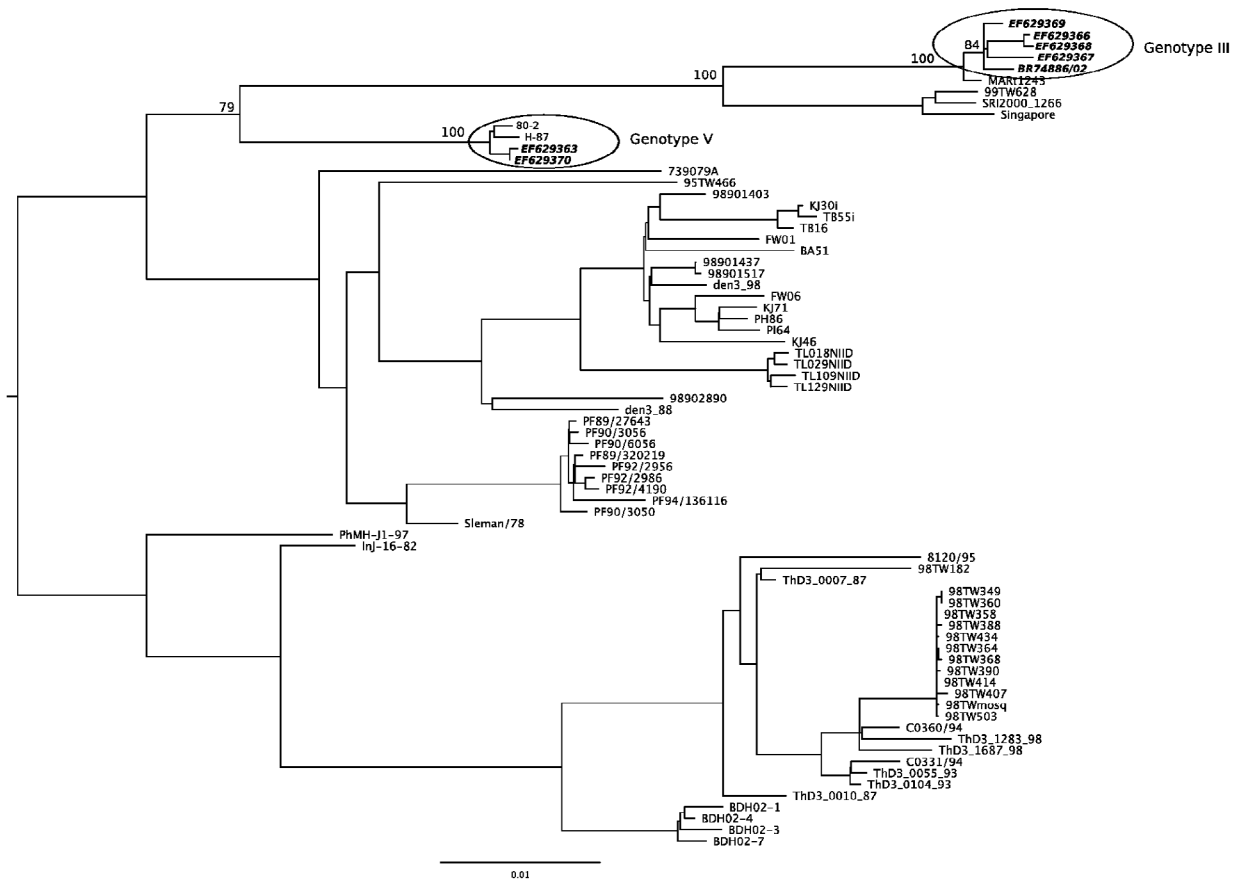


Fig. 2: maximum likelihood phylogram describing phylogenetic relationships among the Brazilian DENV-3 isolates and the reference panel based on the complete genome nucleotide sequences. Brazilian samples are in *italics* and in **bold**. Bootstrap values are provided next to the relevant nodes. GenBank accession numbers of all virus strains included in this analysis are listed in the supplementary data.

circulating in Northern Brazil, samples of DENV-3 from RJ, and those retrieved from databases. It should be emphasized that only DENV-3 genotype III was identified during the 2002 to 2003 epidemic in samples from Porto Velho (Aquino et al. 2006) and RJ (Nogueira et al. 2005), and this genotype is the only one to have been implicated in DENV-3 epidemics in the Americas (Usuku et al. 2001, Messer et al. 2003, Uzcatogui et al. 2003, Peyrefitte et al. 2005, Rigau-Pérez & Laufer 2006, Ocazonez et al. 2006). When samples received from Porto Velho were used to infect C6/36 cells, they displayed a cytotoxic effect not seen with other DENV-3 viral isolates (data not shown). These findings led to the molecular characterization of these samples. Viral genome sequences of five isolates indicated that DENV-3 genotypes III and V co-circulated during the 2002 epidemic in RO. We analyzed three samples from AC, all of which were of genotype III, as well as the isolate from RJ. However, due to the small number of samples studied, we cannot rule out the possibility that another genotype was also circulating in those regions. The virus collection of our institute (ICC-Fiocruz) does not include DENV-3 strains H87 (M93130, Osatomi & Sumiyoshi 1990), 80-2 (AF317645), or any other DENV-3 genotype V strain, and these strains had never been manipulated in our laboratories. Sample contamination was therefore highly unlikely. Further-

more, two of the eight samples from RO and seven of the 12 samples from AC tested negative. Moreover, viral RNA for BR DEN3/RO4-02 and BR DEN3/RO5-02 was obtained directly from plasma samples. It is worth mentioning that our data was recently corroborated by similar findings in Colombia (José Usme Ciro and Juan Carlos Gallego-Gómez, unpublished observations) which showed that DENV-3 genotype V had also been isolated from human cases in Colombia during the 2003-2005 epidemics.

Aquino et al. (2006) recently demonstrated by phylogenetic analysis with partial nucleotide sequences for the E protein and 3'UTR that Brazilian DENV-3 (particularly from RO) are grouped with samples from Sri Lanka, Samoa and other American genotype III DENV-3. These authors also suggested that DENV-3 had been introduced at least twice into Brazil, once via RJ and the second via the Caribbean countries. More recently, Figueiredo et al. (2008) demonstrated the co-circulation of two genotypes of DENV-3 in Minas Gerais from 2002 to 2004. A larger number of viral isolates should be analyzed in other Brazilian states and South American countries to identify the circulating dengue genotypes, and to track the dynamics of virus introduction and maintenance in nature. The DENV-3 genotype classification is a controversial matter. Wittke et al. (2002) have re-classified the China

80-2 strain, formerly classified as genotype I, as genotype V based on E gene sequences. Aquino et al. (2006) have followed this classification. On the other hand, Figueiredo et al. (2008), using C/prM gene sequences, classified the same strain as belonging to genotype I. We decided to adopt the Wittke et al. (2002) classification as it provided a higher level of genotype discrimination. Following this, we classified our strains as belonging to genotypes III (AC) and V (RO). However, we acknowledge that DENV-3 genotype classification is still controversial. Intra-serotype genetic diversity in DENV vary greatly on a temporal scale, and it has become clear that individual lineages or entire virus clades frequently arise, persist for a period of time, and then disappear (Zhang et al. 2005). Therefore, more precise criteria for genotype classification of dengue virus are essential to avoid different nomenclature for similar strains.

The results obtained in this study raise some intriguing questions: how can a recent clinical viral isolate from South America display 99.9% identity with a laboratory viral strain (DENV-3 80-2) isolated from a DF patient in China? Will it be possible to trace the route by which these viruses entered the Americas? Interestingly, the DENV-3 genotype V strains H-87 (L11423) isolated from a human case in the Philippines in 1956, D3-73NI-ID (AB111085) isolated in 1973 from an imported human case in Japan, and 80-2 (AF317645) isolated in China in 1980, also display a remarkably high level of nucleotide sequence conservation (over 99%) with each other and with some of the viruses included in this study. The most dramatic case of sequence similarity is illustrated by the three viral isolates from RO; they display 100% sequence identity with each other. These three cases are probably linked epidemiologically, but further efforts are needed to elucidate whether they represent a single chain of infection.

Further genome characterization of viruses from other South American countries that have also experienced unusual DENV-3 epidemics should shed light on this issue.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Paulo Arauco for technical help with sequencing and Anacleto Felinni, from LACEN-Curitiba, for the dengue serum samples.

REFERENCES

- Aquino VH, Anatriello E, Gonçalves PF, Silva EV, Vasconcelos PFC, Vieira DS, Batista WC, Bobadilla ML, Vasquez C, Moran M, Figueiredo LTM 2006. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg* 75: 710-715.
- CDC - Center for Disease Control and Prevention 1995. Dengue type 3 infection: Nicaragua and Panama. *JAMA* 273: 840-841.
- Cordeiro MT, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Oliveira VF, Melo WT, Carvalho EF 2007. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 605-611.
- Cummings DA, Schwartz IB, Billings L, Shaw LB, Burke DS 2005. Dynamic effects of antibody-dependent enhancement on the fitness of viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15259-15264.
- De Simone TS, Nogueira RMR, Araújo ESM, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, Souza RV, Teixeira FG, Miagostovich MP 2004. Dengue virus (DENV) surveillance: the co-circulation of DENV-1, 2 and 3 in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 553-562.
- Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS 2008. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci* 267: 36-40.
- Duarte dos Santos CN, Frenkiel MP, Courageot MP, Rocha CF, Vazeille-Falcoz MC, Wien MW, Rey FA, Deubel V, Desprès P 2000. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology* 274: 292-308.
- Duarte dos Santos CN, Rocha CF, Cordeiro M, Fragoço SP, Rey FA, Deubel V, Desprès P 2002. Sequence analysis of dengue type-1 virus strains obtained in Brazil in 1990 and 2001 reveal a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res* 90: 197-205.
- Figueiredo L, Cecillio AB, Ferreira GP, Drumond BP, Oliveira JG, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG 2008. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14: 314-316.
- Gubler DJ, Clark GG 1995. Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1: 55-57.
- Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Rodriguez AM, Kouri RG, De Los Reyes J, Acevedo F 1996. Dengue in Nicaragua, 1994: reintroduction of serotype 3 in the Americas. *Bol Of Sanit Panam* 121: 102-110.
- Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT 2005. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine* 4: 849-856.
- Jobb G, von Haeseler A, Strimmer K 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* 4: 18.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Chacon IV, Ramos C, Rico-Hesse R 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73: 4738-4747.
- Mangada MN, Igarashi A 1998. Molecular and *in vitro* analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology* 244: 458-466.
- Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, Silva AM 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 9: 800-809.
- Mondini A, Bronzoni RV, Cardeal IL, Dos Santos TM, Lázaro E, Nunes SH, Silva GC, Madrid MC, Rahal P, Figueiredo LT, Chiaravalloti FN, Nogueira ML 2007. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J Clin Virol* 40: 84-86.
- Miagostovich MP, Santos FB, Fumian TM, Guimarães FR, Costa EV, Tavares FN, Oliveira JC, Nogueira RMR 2006. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 307-313.
- Miagostovich MP, Santos FB, Simone TS, Costa EV, Filippis AMB, Schatzmayr HG, Nogueira RM 2002. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res* 35: 869-872.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 925-926.
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FB, Cunha

- RV, Coelho JO, De Souza LJ, Guimarães FR, de Araújo ES, De Simone TS, Baran M, Teixeira G Jr, Miagostovich MP 2005. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 11: 1376-1381.
- Ocazionez RE, Cortés FM, Villar LA, Gómez SY 2006. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 725-731.
- Osatomi K, Sumiyoshi H 1990. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology* 176: 643-647.
- Pandey BD, Igarashi A 2000. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol* 44: 179-188.
- Peyrefitte CN, Pastorino BAM, Bessaud M, Gravier P, Tock F, Couissinier-Paris P, Martial J, Huc-Anais P, Césaire R, Grandadam M, Tolou HJ 2005. Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003-2004. *Emerg Infect Dis* 11: 757-761.
- Rico-Hesse R 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59: 315-341.
- Rigau-Pérez JG, Laufer MK 2006. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: Diagnosis and clinical alarm signals. *Clin Infect Dis* 42: 1241-1246.
- Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, Pereira LE, Souza RP, Coimbra TLM, Bessa TAF, Oshiro FM, Lima LBQ, Cerroni MP, Marti AT, Barbosa VM, Katz G, Suzuki A 2005. ST Louis Encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47: 281-285.
- Shimodaira H, Hasegawa H 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol Biol Evol* 16: 1114-1116.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Usuku S, Castillo L, Sugimoto C, Noguchi Y, Yogo Y, Kobayashi N 2001. Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. *Arch Virol* 146: 1381-1390.
- Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, Sierra G, Uzcategui RC, James WS, Turner S, Holmes EC, Gould EA 2003. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* 84: 1569-1575.
- Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG 2002. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 301: 148-156.
- Zhang C, Mammen Jr MP, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Holmes EC 2005. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol* 79: 15123-15130.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Case report

Evidence of circulation of Laguna Negra-like hantavirus in the Central West of Brazil: Case report

Sonia Mara Raboni^{a,b}, Luana de Borba^a, Federico G. Hoffmann^a, Lucia de Noronha^c,
Marin Luize Viola Azevedo^c, Suzana Carstensen^a, Giovanny A.C.A. Mazzarotto^a,
Juliano Bordignon^a, Claudia Nunes Duarte dos Santos^{a,*}

^a Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz/PR, Brazil^b Universidade Federal do Paraná, Brazil^c Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, PUCPR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2009

Accepted 23 March 2009

Keywords:

Hantavirus pulmonary syndrome

Genetic characterization

Phylogeny

Laguna Negra-like virus

ABSTRACT

Background: Hantavirus pulmonary syndrome has been reported with increasing frequency in some Brazilian regions, but information about viral genetic identification is still limited. Recently, the state of Mato Grosso, in the Legal Amazon of Brazil, experienced a growing number of hantavirus pulmonary syndrome (HPS) cases but the genetic characterization of the causative hantavirus is still missing.

Objectives: Our goal was to identify the hantavirus strain involved in a fatal HPS case in the Central region of Brazil.

Study design: Nested RT-PCR was conducted on blood clot samples from an HPS patient from Mato Grosso. PCR-positive samples were sequenced, and the resulting sequences were compared with reference samples. Viral antigens were detected by immunohistological analyses in lung and liver tissues.

Results: Analyses of the viral RNA isolated from the patient identified a Laguna Negra (LN)-like virus as the causative agent and histological analysis of lung sections were compatible with the genetic characterization.

Conclusions: This is the first report of circulation and human infection by a Laguna Negra-like hantavirus in Brazil.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Hantaviruses are serologically related members of the family *Bunyaviridae* that occur worldwide in association with rodents and insectivore carriers. These viruses have been linked with two distinct diseases: hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus pulmonary syndrome (HPS).¹

In Brazil, a surveillance program was implemented in 1993 to monitor HPS cases.² Afterwards, evidence for hantavirus infection was described in various regions. In order to identify the hantavirus strain involved with human infections, rodents have been sampled in diverse ecosystems and these studies have uncovered significant genetic diversity among the viruses described. Four different hantaviruses have been associated with HPS cases in Brazil so far, all of them associated with rodent species as hosts. Juquitiba-like virus is associated with *Oligoryzomys nigripes* and is found in the Atlantic

rainforest and in the south and southeast, Araraquara virus is associated with *Necromys lasiurus* and is found in the savanna (cerrado) region and the central plateau, Castelo dos Sonhos virus is associated with *Oligoryzomys moojeni* and occurs in the Amazon region, and Anajatuba virus is associated with *Oligoryzomys fornesii* and is detected in the northeastern region.^{3–10}

The state of Mato Grosso is located in the central west region of Brazil, it is part of legal Amazon and in its west borders Bolivia. Most of the state is covered by equatorial forest. In the west region the *cerrado*, formed by trees up 10 m high used to predominate. However, the *cerrado* has now been replaced by agricultural production and pasture in large parts of the state. Human population in the region has grown sharply in the last decade because of migration. Associated with the increase in human population, a growing number of HPS cases have been noted by the Brazilian Ministry of Health.

2. Objectives

The objective of this study is identifying the hantavirus strain related to a fatal HPS case in Mato Grosso state, Brazil and

* Corresponding author at: Instituto Carlos Chagas, ICC/Fiocruz/PR, Rua Prof. Alga-cyr Munhoz Mader 3775, CIC, 81350 010, Curitiba, PR, Brazil. Tel.: +55 41 316 3230; fax: +55 41 316 3267.

E-mail address: clsantos@tecpar.br (C.N. Duarte dos Santos).

determined its phylogenetic relationship with circulating South American hantaviruses.

3. Study design

Serum and clot samples from a patient with suggestive symptoms of hantavirus infection were tested using specific IgM and IgG antibody assays (ELISA) and RT-PCR for viral RNA detection. Partial viral genomic S segment was sequenced and genotyped by phylogenetic reconstruction. In addition, histopathological and immunohistochemical studies were performed in tissues sections of lung and liver aiming to characterize the main target sites during hantavirus infection.

4. Results

The patient was a 19-year-old man farm worker, previously healthy, who lived in Campo Novo do Parecis, in the west of Mato Grosso (13°40'31"S 57°53'31"W). He was admitted to hospital reporting 3 days of flu-like symptoms, and after hospitalization, he developed malaise, high fever, myalgia, headache, dry cough, tiredness, dyspnea, back pain, nausea, vomits, abdominal pain and diarrhea. The initial treatment was intravenous administration of one liter of normal saline solution and symptomatic drugs. Due to ongoing hypotension and hypoxia, the patient was maintained with oxygenoterapy. Vasopressors and inotropes drugs were used to uphold blood pressure and cardiac output. Three hours after his admission at the hospital, he had an asystolic cardiac arrest and resuscitation efforts were unsuccessful.

In the postmortem examination, the main histopathological features were seen in the lung, where microscopic examination revealed a moderate interstitial pneumonitis with evidence of marked pulmonary edema and very mild and focal lymphoid infil-

trate. Extensive amounts of edema fluid were seen within the alveoli. Vascular thrombi, endothelial cell necrosis, focal hemorrhages, ischemic necrosis lesions, cellular responses of neutrophils and respiratory epithelium lesions were absent. Morphological changes of the endothelium, when present, consisted of swollen endothelial cells. Microscopic examination of the liver revealed a severe degree of congestion and clusters of hypertrophic and hyperplastic Kupffer cells.

Liver and lung tissues were analyzed by immunohistochemistry (IH) assays; the sections of paraffin-embedded tissues were stained with monoclonal antibody to JUQ-like virus (also known as ARAUV) nucleoprotein and a polymer-HRP anti-mouse secondary antibody (Envision⁺ System, DakoCytomation, Inc., CA, USA). The specificity of IH staining was confirmed by replacing first antibodies with phosphate-buffered saline (PBS) or isotypes-identical murine antibodies and a flavivirus monoclonal antibody (4G2). Control tissues included hantavirus infected cells as well as non-HPS autopsy tissues. Viral nucleoproteins were detected in the cytoplasm of the endothelial cells and in infiltrated mononuclear cells from lung (Fig. 1).

Serologic examination of blood samples, using JUQ-like virus recombinant nucleoprotein antigen¹¹ were positive for IgM and IgG. Viral RNA was extracted from blood clot using the High Pure Viral RNA kit (Roche Inc., Mannheim, GE), PCR products were synthesized by nested reverse transcriptase-PCR, primers were selected to amplify S and M segments, as previously reported.^{12,13} One genomic fragment that covers the complete coding sequence of the nucleocapsid protein gene from the S segment was obtained (1584 bp). The amplified PCR product was purified using Wizard PCR Preps. (Promega, Madison, WI, USA), and cloned into the pGEM-T easy vector (Promega, Madison, USA). Four independent clones were sequenced using an ABI 310 instrument. The nucleotide sequence had been deposited in the GenBank under the accession number

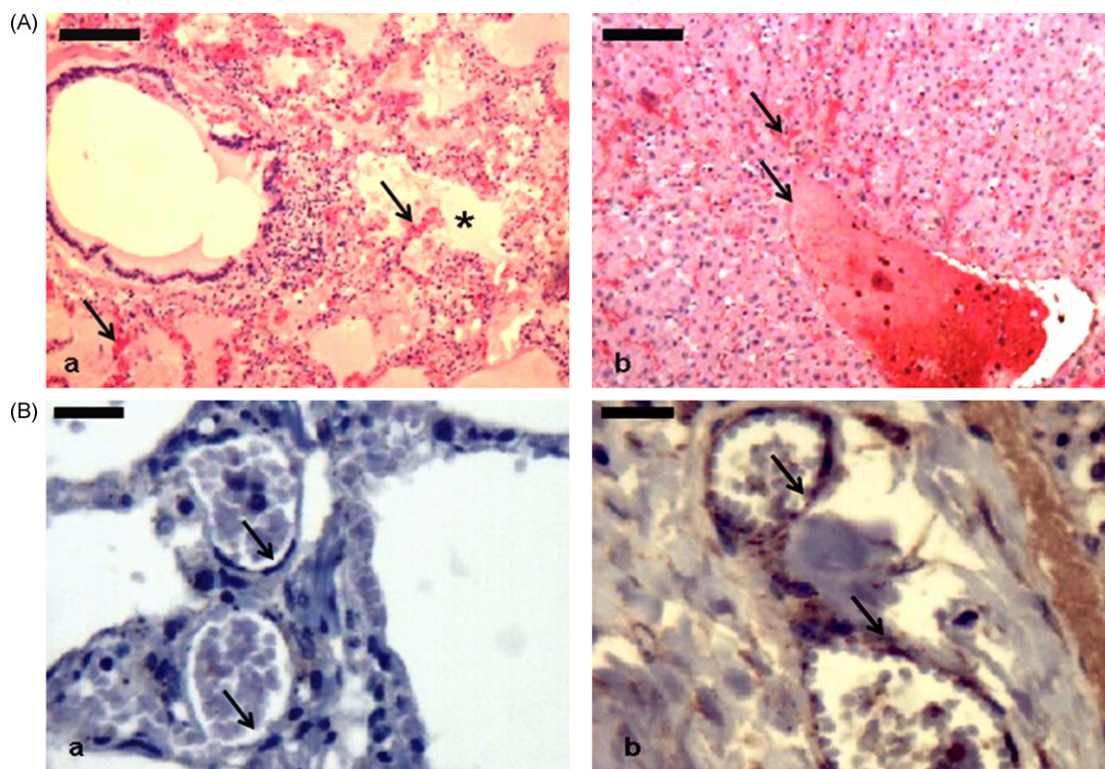


Fig. 1. Pathological findings in lung and liver tissues of a fatal case of HPS (A), and immunohistochemistry reaction (B). Hematoxylin–eosin reaction demonstrated severe capillary congestion (arrow) and extensive edema fluid in alveoli (*) (A-a). In the liver a severe degree of microvasculature congestion is noted (arrows) (A-b). The immunohistochemistry reaction confirms the HPS diagnosis, as demonstrated by the positive reaction with JUQ-like virus Mab 313/11E in contrast with the reaction using the isotype control 4G2 Mab (anti-flavivirus group-specific) (B-b and B-a).

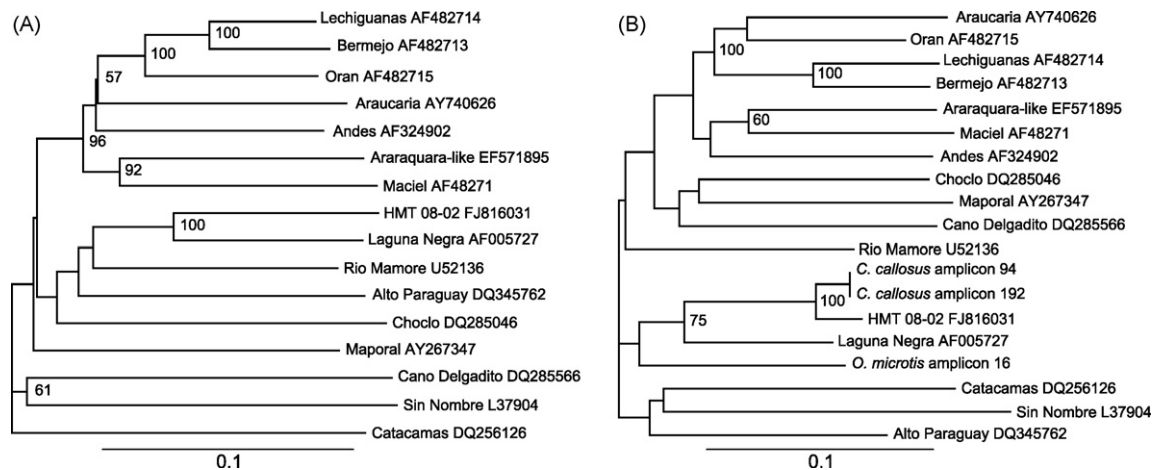


Fig. 2. Panel A. Neighbor-joining tree based on a 1,287 bp alignment of the complete coding sequence of the gene encoding for the nucleocapsid protein (N), depicting phylogenetic relationships between viral sequences from the human patient in our study (HMT 08/02), and a reference panel obtained from Genbank. Panel B. Neighbor-joining tree based on a 291-basepairs alignment of the gene encoding for the nucleocapsid protein (N), depicting phylogenetic relationships between viral sequences from the human patient in our study (HMT 08/02), and a reference panel obtained from Genbank, with 3 additional sequences from Carroll et al.¹⁴ In the two cases sequences collected in the human patient HMT 08/02 were similar to sequences from the Laguna Negra virus (from western Paraguay and Bolivia). Sequences were aligned with ClustalW¹⁹ and in MEGA version 4²⁰ using the maximum composite likelihood estimates of the Tamura-Nei distance.^{21,22} Support for the nodes was evaluated with 1000 bootstrap pseudoreplicates.²³

FJ816031. A comparison of the sequence from nucleocapsid gene showed that the closest match to the new sequence was the Laguna Negra virus, which was 86% similar at the nucleotide level, and 96% at the amino acid level. These results were confirmed by neighbor-joining phylogenies (Fig. 2).

Experiments involving human samples were approved by Ethical Committee from Brazilian Ministry of Health (CONEP) under protocol no. 10573.

5. Discussion

In Brazil, despite the increasing training of medical personnel to recognize the clinical symptoms of HPS, mortality rate is still high (~40%). The demarcation of hantavirus transmission areas and the characterization of circulating virus should contribute to better direct control measures. To identify its causative agent, we studied a fatal HPS case from the state of Mato Grosso, in the central region of Brazil. This area is of special interest because it presents a growing number of hantavirus infections, and borders Bolivia, where hantavirus circulation is well documented.^{14–16}

In an ecological assessment in Santa Cruz, Bolivia, Carroll et al.¹⁴ found two rodent species with antibodies for hantavirus, *Oligoryzomys microtis* and *Calomys callosus*. The viral nucleotide sequences isolated from two *C. callosus* were 87–88% similar to the Laguna Negra virus and 99% identical to viral sequences obtained from HPS patients in this area, implicating *C. callosus* as the host of Laguna Negra virus. More recently, IgG anti-hantavirus positive *Calomys laucha* rodents were detected in Mato Grosso.¹⁷ Our phylogenetic analysis from the hantavirus of a fatal HPS case grouped this virus with the Laguna-Negra hantavirus (Fig. 2).

The observed pulmonary histopathological features are in agreement with those described by Zaki et al.¹⁸ consisting of an interstitial pneumonitis with a variable mononuclear cell infiltrate, edema, and focal hyaline membranes. IHC analysis showed widespread presence of hantaviral antigens in endothelial cells of the microvasculature in the lung. Hantaviral antigens were also observed within follicular dendritic cells, macrophages, and lymphocytes.

In this report we confirmed the circulation of a Laguna Negra-like hantavirus virus in the west of Brazil and emphasize the importance of monitoring the seroprevalence for hantaviruses in

rodent hosts from different regions of Brazil. In addition, the genetic characterization of the involved viruses, is critical to implementing adequate control measures to protect the exposed populations in regions which were previously free of hantavirus infection.

Conflict of interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgments

We are indebted with Gisélia Rubio from Departamento de Vigilância, SESA-PR and Irene Skraba from LACEN-PR. The authors thank CNPq, CNPq/Prosul, Fiocruz, Fundação Araucária, CYTED/RIVE and Fundo Paraná for financial support. LB, FGH, SC, GACA, JB and CNDs are CNPq fellowship recipients.

References

- Butler JC, Peters CJ. Hantaviruses and hantavirus pulmonary syndrome. *Clin Infect Dis* 1994;**19**:387–95.
- Coordenação de Controle de Vetores e Antropozoonoses SdVeSmdSB. Dados do Programa de Controle da Hantavirose no Brasil de 1993 a 2008. <http://www.saude.gov.br/svs>.
- Johnson AM, de Souza LT, Ferreira IB, Pereira LE, Ksiazek TG, Rollin PE, et al. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* 1999;**59**:527–35.
- Suzuki A, Bisordi I, Levis S, Garcia J, Pereira LE, Souza RP, et al. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2004;**10**:2127–34.
- Figueiredo LT, Moreli ML, Campos GM, Sousa RL. Hantaviruses in São Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:891–2.
- Rosa ES, Mills JN, Padula PJ, Elkhoury MR, Ksiazek TG, Mendes WS, et al. Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005;**5**:11–9.
- Figueiredo LTM, Moreli ML, Borges AA, Figueiredo GG, Souza RLM, Aquino VH. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. *Braz J Med Biol Res* 2008;**41**:596–9.
- Rosa ES, Lemos ERS, Medeiros DBA, Nunes MRT, Smith DB, Silva OV, et al. Associação dos casos de síndrome cardiopulmonar por hantavírus na área de influência da BR 324 com o vírus Laguna Negra. In: *Abstract of the II workshop Nacional sobre Pesquisas aplicadas em Hantavirus*. 2008, abstract 05. Health Ministry of Brazil.
- Rosa ES, Medeiros DBA, Teixeira MR, Smith DB, Pereira AS, Lavocat M, et al. Identificação do vírus Castelo dos Sonhos em roedores *Oligoryzomys moojeni* em Campo Novo do Parecis. In: *Abstract of II workshop Nacional sobre Pesquisas aplicadas em Hantavirus*. 2008, abstract 32. Health Ministry of Brazil.

10. Delfraro A, Tomé L, D'Elia G, Clara M, Achával F, Russi JC, et al. Juquitiba-like hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerg Infect Dis* 2008;**14**:1447–51.
11. Raboni SM, Levis S, Rosa EST, Bisordi I, Delfraro A, Lemos E, et al. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;**58**:89–97.
12. Raboni SM, Probst CM, Bordinon J, Zeferino A, Duarte dos Santos CN. Hantaviruses in Central South America: phylogenetic analysis of the S segment from HPS cases in Paraná, Brazil. *J Med Virol* 2005;**76**:553–62.
13. Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, et al. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 1997;**238**:115–27.
14. Carroll DS, Mills JN, Montgomery JM, Bausch DG, Blair PJ, Burans JP, et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 2005;**72**:42–6.
15. Padula P, Della Valle MG, Alai MG, Cortada P, Villagra M, Gianella A. Andes virus and first case report of Bermejo virus causing fatal pulmonary syndrome. *Emerg Infect Dis* 2002;**8**:437–9.
16. Padula PJ, Colavecchia SB, Martínez VP, Gonzalez Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SD, et al. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:3029–35.
17. Rosa ES, Lemos ERS, Medeiros DBA, Nunes MRT, Smith DB, Silva OV, et al. Associação dos casos de síndrome cardiopulmonar por hantavirus na área de influência da BR 324 com o vírus Laguna Negra. In: *Abstract of II workshop Nacional sobre Pesquisas aplicadas em Hantavirus*. 2008, abstract 05. Health Ministry of Brazil.
18. Zaki SR, Greer PW, Coffield LM, Goldsmith CS, Nolte KB, Foucar K, et al. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 1995;**146**:552–79.
19. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 1994;**22**:4673–80.
20. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007;**24**:1596–9.
21. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993;**10**:512–26.
22. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring 253 very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:11030–5.
23. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;**39**:783–91.



Short communication

Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02)

Ana Luiza Pamplona Mosimann^a, Luana de Borba^a, Juliano Bordignon^a, Peter W. Mason^b, Claudia N. Duarte dos Santos^{a,*}^a Instituto Carlos Chagas-Fiocruz/PR, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 Curitiba, Paraná, Brazil^b Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, 3.206B Mary Moody Northen Pavilion, 301 University Boulevard, Galveston, TX 77555-0436, USA

A B S T R A C T

Article history:

Received 15 May 2009

Received in revised form 25 August 2009

Accepted 7 September 2009

Available online 15 September 2009

Keywords:

Flavivirus

Dengue virus serotype 3

Replicon

Dengue viruses (DENV) cause the most common arboviral disease afflicting men. Clinical manifestations range from asymptomatic to dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). The mechanisms involved in the disease pathogenesis are not fully understood. The severity of the disease seems to be influenced by both viral and host factors. Subgenomic replicons of DENV can be used to study viral replication mechanisms and evaluate the effects of antiviral drugs on viral replication. The objective was to generate and characterize biologically a replicon from a clinical isolate of DENV-3, as part of our studies to understand how this new isolate interacts with cells. To obtain this replicon several RT-PCR fragments encoding the non-structural proteins genes were cloned in high-copy vectors, and used to assemble the replicon in a BAC plasmid vector containing a synthetic DNA molecule encoding the 5' and 3' ends of a viral cDNA with a T7 DNA-dependent RNA polymerase promoter and a ribozyme. *In vitro* transcribed RNA recovered from this BAC plasmid was transfected into C6/36 mosquito cells, and dengue virus protein expression was assessed by indirect immunofluorescence using polyclonal antibodies. The results showed that the replicon was replicated efficiently in cells, demonstrating successful assembly of a DENV-3 replicon.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Dengue viruses (DENV) are the causative agent of the most prevalent arthropod-borne viral disease afflicting mankind. These viruses belong to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae* and are single-stranded RNA viruses with a genome of approximately 11 kb in length. The viral genome contains two terminal untranslated regions (UTRs) and encodes for three structural (C, prM and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) which are translated into a polyprotein that is processed by viral and host proteases (Chambers et al., 1990). DENV are classified immunologically in four different serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4, all of which have the potential to cause disease in man. The spectrum of clinical manifestations is broad and can range from an asymptomatic infection to dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). The mechanisms involved in the disease pathogenesis are not well understood and are still a challenge. The severity of clinical presentation seems to result from both viral factors and host immune response (Halstead et al., 1973; Halstead and O'Rourke, 1977; Rosen, 1977; Mongkolsapaya et al., 2003). No specific treatments or licensed vac-

cines are available to treat or prevent dengue. In this manuscript the construction of a subgenomic replicon from a DENV-3 strain that has emerged recently in South America is described. This replicon should be useful for studying many aspects of DENV-3 replication, and will be valuable for the development of a reverse genetics system that should aid in our studies to understand this newly emerged strain of DENV-3.

Replicons have all the elements needed for the replication of the viral genetic material in cells, but do not encode the functional structural proteins and consequently are not able to generate new viral particles (Jones et al., 2005a). Among the *Flaviviruses* the only viruses for which subgenomic replicon systems have been reported are: DENV-2 (Pang et al., 2001; Alvarez et al., 2005a; Jones et al., 2005b; Holden et al., 2006; Ng et al., 2007), DENV-1 (Suzuki et al., 2007), Yellow fever virus (Corver et al., 2003; Jones et al., 2005a), Kunjin virus (Khromykh and Westaway, 1997), Tick-borne encephalitis virus (Gehrke et al., 2003), Japanese encephalitis virus (Yun et al., 2007), Omsk hemorrhagic fever virus (Yoshii and Holbrook, 2009) and West Nile virus (Yamshchikov et al., 2001; Shi et al., 2002; Scholle et al., 2004; Rossi et al., 2005) (Table 1). Currently these replicons represent powerful research instruments and are being used to help define the role of mutations in the non-structural proteins (Suzuki et al., 2007), to study viral replication

* Corresponding author. Tel.: +55 41 33163234; fax: +55 41 33163267.

E-mail address: clsantos@tecpar.br (C.N.D.d. Santos).

Table 1
Flavivirus replicons.

Virus	Vector	Bacterial or yeast strain	Promoter	Extra 5' and 3' nucleotides	5'C	3'E	Ribozyme	Structure of the reporter gene/Resistance gene (location)	CPE	Cell	RNA introduction	References
KUNV	pBR322	DH5 α	SP6(+G)	Yes (5' and 3')	321 nt or 60 nt	66 nt	No	IRES-CAT or IRES-NEO (3'UTR Δ 76)	No	BHK-21	Electroporation	Khromykh and Westaway (1997) Yamshchikov et al. (2001) Pang et al. (2001)
WNV	pBR322	HB101	SP6(+G)	Yes (5' and 3')	69 nt	X	No	No	Yes	BHK-21	Electroporation	
DENV2	pBR424	STBL2 and YPH857	SP6 or CMV	X	363 nt or 60 nt	72 nt	Yes/No	No	X	LLC-MK2	Electroporation	Shi et al. (2002)
WNV	pBR322	HB101	T7(+G)	No	93 nt	90 nt	No	IRES-GFP or IRES-NEO (3'UTR)	No	BHK-21	Electroporation	Gehrke et al. (2003)
TBEV	pBR322	HB101	T7(+G)	Yes (5')	300 nt or 81 nt	69 nt	No	No	X	BHK-21	Electroporation	Corver et al. (2003)
YFV	pBeloBAC11	X	SP6	X	291 nt, 150 nt or 60 nt	X	No	No	X	BHK-21	Lipofectamine	Scholle et al. (2004)
WNV	X	X	T7	X	93 nt	X	No	IRES-tat-2A-NEO or IRES-GFP-2A-NEO (3'UTR)	X	BHK-21	Electroporation	Rossi et al. (2005)
WNV	pACNR	X	T7	Yes (3')	X	X	Yes	IRES-tat-2A-NEO, IRES-LUC-2A-NEO or IRES-GFP-2A-NEO (3'UTR)	X	BHK-21, Vero and Huh7	Electroporation	Jones et al. (2005a)
YFV	pACNR	X	SP6(+G)	Yes (5' and 3')	63 nt	72 nt	No	IRES-GFP, IRES-LUC or IRES-NEO (3'UTR)/GFP-2A or LUC-2A (C-ssNS1)	No or little	BHK-15	Electroporation	
DENV2	pBR322	X	T7	Yes (3')	102 nt	72 nt	No	LUC-2A (C-ssNS1)	X	BHK-21 and C6/36	Lipofectamine	Alvarez et al. (2005a)
DENV2	pWSK29	DH5 α	T7(+G)	Yes (5' and 3')	81 nt	72 nt	No	PAC-2A (C-ssNS1)	X	K562 and THP-1	X	Jones et al. (2005b)
DENV2	pBR322	X	T7	No	72 nt	90 nt	Yes	LUC-2A (C-ssNS1)	X	BHK-15	Lipofectamine	Holden et al. (2006)
DENV1	pACNR and pBeloBAC11	X	T7(+G)	Yes (5')	X	X	Yes/No	No or IRES-LUC (3'UTR Δ 169)	X	BHK-21	Electroporation	Suzuki et al. (2007)
DENV2	pWSK29	Top10	T7(+G)	Yes (5' or 5' and 3')	66 nt	72 nt	Yes/No	PAC-2A-GFP-IRES or PAC-2A-LUC-IRES (C-ssNS1)	X	BHK-21	Electroporation	Ng et al. (2007)
JEV	pBeloBAC11	X	SP6(+G)	Yes (5')	X*	X*	No	IRES-LUC, IRES-LacZ or IRES-GFP (3'UTR)	X	BHK-21	Electroporation	Yun et al. (2007)
OHFV	pACNR	X	T7(+G)	Yes (5')	81 nt	69 nt	Yes	GFP-2A or LUC-2A (C-ssNS1)	No	BHK-21	TransIT-mRNA	Yoshii and Holbrook (2009)

X = no information available; 5'C = number of nucleotides coding for the 5' end of the C protein that were retained; 3'E = number of nucleotides coding for the 3' end of the E Protein that were retained; nt = nucleotides; 3'UTR = gene insertion at the 3'UTR; C-ssNS1 = gene insertion at the junction of the retained capsid and NS1 signal sequence; Δ = deletion; DENV = Dengue virus; JEV = Japanese encephalitis virus; KUNV = Kunjin virus; OHFV = Omsk hemorrhagic fever virus; TBEV = Tick borne encephalitis Virus; WNV = West Nile virus; YFN = Yellow fever virus; 2A = autoproteolytic peptide from foot and mouth disease virus; CAT = chloramphenicol acetyltransferase; GFP = green fluorescent protein; IRES = Internal ribosome entry site; LacZ = β -galactosidase; LUC = luciferase; NEO = neomycin phosphotransferase; PAC = puromycin n-acetyltransferase.

* These authors deleted or completely the ectodomains of the structural proteins and maintained all or part of their transmembrane domains.

(Alvarez et al., 2005a; Alvarez et al., 2005b; Bredenbeek et al., 2003) and to test antiviral drugs (Holden et al., 2006; Ng et al., 2007; Rossi et al., 2005). They are also being used in the development of different genetic vaccines based on self-replicating non-infectious RNA, either through the expression of heterologous genes or through the partial expression of its structural genes (prM-E) (Kofler et al., 2004; Ishikawa et al., 2008; Widman et al., 2008).

The objective of this work was to construct and characterize biologically a replicon generated from a recent clinical isolate of a Brazilian dengue virus serotype 3 (GenBank accession no. EF629369, BR DEN3 290-02 BR) (Nogueira et al., 2008). The choice of this serotype was due to its predominance in Brazil in the last epidemics (Ministério da saúde, 2006; Ministério da Saúde, 2007, 2008a). Furthermore, the introduction of this new DENV-3 into Brazilian territory in 2000 (Nogueira et al., 2007) coincided with a raise in the disease severity and fatalities (Ministério da saúde, 2008b). To our knowledge this is the first description of a DENV-3 replicon, the main advantage of which is to provide the best background for testing differences in the non-structural region that are peculiar to serotype 3 viruses.

The first step to produce this replicon was to amplify by RT-PCR the different segments of the BR DEN3 290-02 strain using high-fidelity enzymes (ImProm-IITM Reverse Transcription System, Promega, Madison, WI, USA and TripleMaster[®] PCR System, Eppendorf, Westbury, NY, USA). The sequence of the primers (5' → 3') used for RT-PCRs are: D3.7: GGAGTTCTCTTGACTTGG, D3.29: GCAATTGCTCTATTTCCTG, U449: CTGAAACGCGTGAAAAACACATCATGTCATTTTCATGC, D3.10: CATGGGAGGAAGAGGCTGAGC, D3.27: CTTCCAGGTGATCTTCCAGAG, D3.28: GGAGAGTGCCTTCACACCTAGCCC, D3.15: GTCACCATGGGACACATCCC, D3.37: AAGTGTGACACCCTGTTGTGTGAC, D3.17: CGTCTGGGGTCTGCAGGG. The resulting segments named D3.7/D3.29, D3.10/D3.27, D3.28/D3.15 and D3.37/D3.17 (see Fig. 1) have been inserted in high-copy plasmids (pGEM[®]-T and pGEM[®]-T-easy, Promega, Madison, WI, USA). Potential clones were identified using the toothpick technique (Barnes, 1977) and their identity confirmed by restriction reactions with SacII (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and SacI endonucleases (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). All positive clones were fully sequenced and used to assemble the replicon in the #50pBAC vector. The U449/D3.6 RT-PCR fragment (Fig. 1) was cloned directly in a low copy plasmid,

#49pAC. The two low-copy vectors #49pAC and #50pBAC used in this study are derived from the plasmids pACDV1poly and pBACDV1poly, respectively, developed by Suzuki et al. (2007). Both were modified so that a synthetic DNA cassette was inserted between BamHI/SwaI restriction sites in the pACDV1poly and NotI/SwaI in the pBACDV1poly (Bio Basic Inc., Markham, ON, Canada). This synthetic cassette comprised a NotI restriction site, the T7 RNA polymerase promoter sequence plus a G, the 5'UTR, the first 56 nucleotides coding for the capsid protein of the BR DEN3 290-02 BR strain, a multiple cloning site (MluI, XhoI, AflII/BspTI, XmaI/SmaI, NheI, AvrII, SphI, NruI, EcoRV and ClaI), the 693 nucleotides coding for the C-terminal portion of the NS5 protein and the 3'UTR of BR DEN3 290-02 strain followed by the hepatitis delta virus ribozyme sequence and a SwaI restriction site. The choice for low copy plasmids was based on previous reports describing insert instability during the construction of flaviviruses infectious clones and replicons (Gritsun and Gould, 1998; Hurrelbrink et al., 1999; Pierro et al., 2006; Shi et al., 2002; Suzuki et al., 2007; Yun et al., 2003). This strategy is believed to circumvent cloning instability and to diminish potential toxic effects related to the cloning of these genomes.

All nucleotide sequencing was performed using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, IA, USA) in a ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, IA, USA). The strategy used to assemble the DENV-3 replicon is illustrated in Fig. 1. Basically it consisted of serial subcloning procedures into low-copy vectors of the fragments comprising the NS1 signal-sequence and all non-structural proteins that had been cloned previously in the high-copy vectors. The structural coding region is absent in the final construct except for the first 56 nucleotides coding for the C protein, which play an important role in the RNA cyclization and are essential for the replication to occur (Bredenbeek et al., 2003; Lo et al., 2003; Alvarez et al., 2005a). This C fragment is fused in frame to the NS1 signal sequence, which is coded in the C-terminal of the E protein, followed by the sequence of all non-structural proteins (NS1 to NS5), the 3'UTR and the sequence corresponding to the hepatitis delta virus ribozyme. The ribozyme assures correct processing of the 3' end. All cloning procedures were done according to standard procedures using Top10 and Top10F' *E. coli* strains (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All plasmid DNA purifications were done using

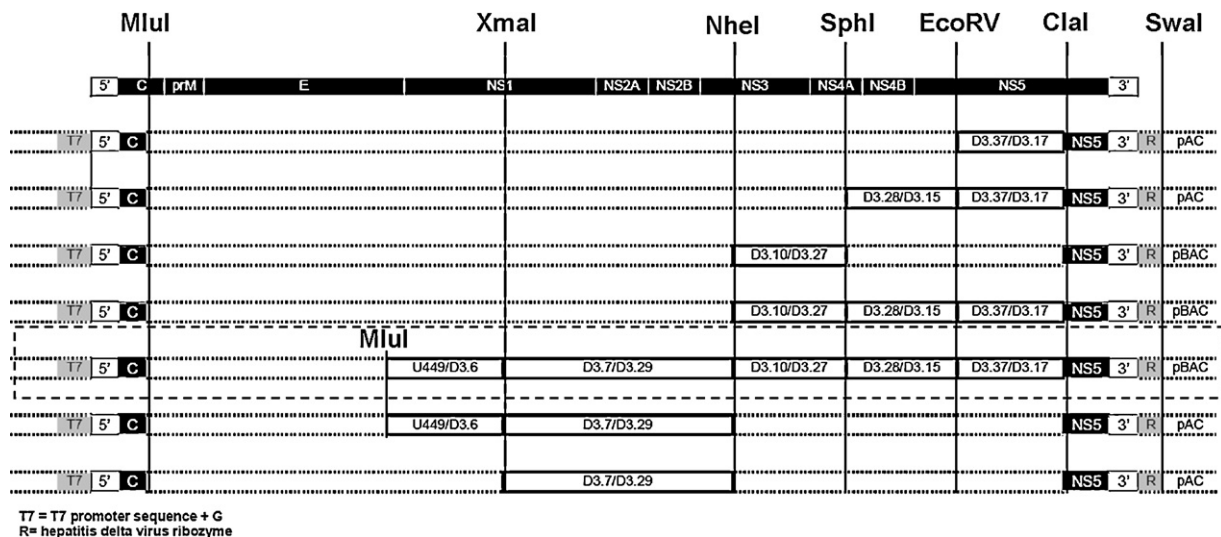


Fig. 1. Schematic representation of the strategy used for the DENV-3 replicon assembly. The BR DEN3 290-02 strain genome is schematically represented in black and white and the enzymes used in the cloning procedures are depicted above it. The steps involved in the replicon assembly are represented below. First the amplified RT-PCR segments (white boxes in bold) were cloned in high-copy vectors (pGEM-T and pGEM-T easy) and then subcloned in low-copy vectors (#49pAC and #50pBAC) as shown. The final construct is represented in the dashed-line box and the intermediate constructs from which it originated are represented above and below it.

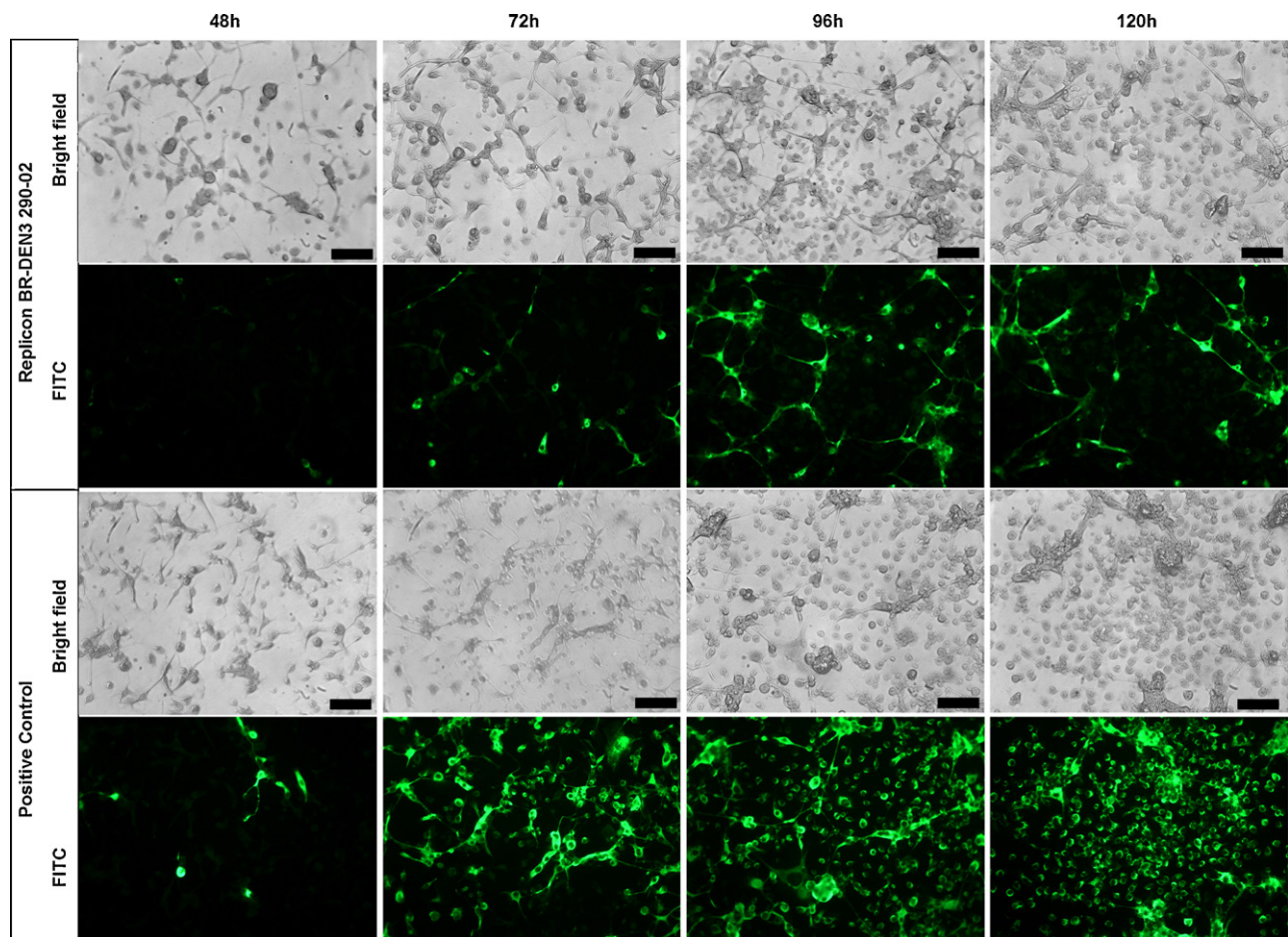


Fig. 2. Immunofluorescence of the C6/36 cultures transfected with the replicon clone BR DEN3 290-02. For immunofluorescence the cells were fixed and incubated with DENV-3 polyclonal antibody followed by anti-mouse conjugated to FITC. Pictures were taken with 200 \times magnification factor and the scale bar in the bright field pictures corresponds to 100 μ m.

the Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) according to manufacturer's recommendations. Top10 and Top10F' strains were chosen because of their recA1 genotype which makes these strains less prone to recombination.

To assess whether the replicon was functional, it was linearized with the SmaI restriction enzyme downstream of the ribozyme (Supplementary Fig. 1), and the resulting template was transcribed *in vitro* using the MEGAscript[®] T7 High Yield Transcription Kit (Ambion, Austin, TX, USA) in the presence of the m⁷G(5')ppp(5')G cap analog (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The *in vitro* synthesized RNA was used to transfect C6/36 mosquito cells with lipofectin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Viral RNA isolated from the supernatant of cell cultures infected with the BR DEN3 290-02 strain was transfected in the same way and used as a positive control. Non-transfected cells were used as a negative control (mock). At different time points (48, 72, 96 and 120 h) posttransfection the supernatants were removed, the cells fixed and analyzed by indirect immunofluorescence assay using DENV-3 polyclonal antibodies (α -DENV-3) or scraped, lysed and subjected to RNA extraction using the RNeasy kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and used in quantitative PCR (qPCR) experiments as described by Poersch et al. (2005). The supernatants from the transfected cultures were titrated to check for virus particles formation by the focus immunodetection technique (Dèsprés et al., 1993).

As shown in Fig. 2, the cells transfected with either the viral or synthetic replicon RNAs showed positive reaction with DENV-3 polyclonal antibody. From these results it can be concluded that the RNAs were transfected efficiently and translated into proteins

that could be recognized by the specific antibody. A raise in the number of positive cells with time could also be observed. This raise was clearly more pronounced in the cultures transfected with the positive control RNA, as expected, but it could also be seen in the cultures transfected with the replicon. This is a good indication that the replicon is effectively replicating. The supernatants from cultures at the different times posttransfection (48 h, 72 h, 96 h and 120 h) were also titrated. As expected, it was not possible to detect the formation of any viral particle from cell cultures that had been transfected with the replicon, as opposed to the positive control-transfected cells which produced infectious virus (Supplementary Fig. 2).

To be certain that these results were not due to contamination an immunofluorescence analysis of the replicon in parallel to the positive and negative controls at 120 h posttransfection using anti-E (α -E, 4G2) (Gentry et al., 1982) and anti-NS1 (α -NS1, 7E11) (Mason et al., 1990) monoclonal antibodies was also performed. As expected, the negative control did not react with any of the antibodies, the viral RNA positive control reacted with both antibodies and the replicon-transfected cells only reacted with the anti-NS1 monoclonal antibody (Supplementary Fig. 3).

To prove that the subgenomic replicon was in fact replicating RNA was extracted from the transfected cells and subjected to qPCR using primers from the structural (DENV-3Fow: CCCATC-CATGACAATGAGATGT and DENV-3Rev: TCAACCCACGTAGCTCCT-GAT) and non-structural (D3.16: GCCACAGGCTCAGCCTCTCC and D3.15: GTCACCATGGGCACCACATCCC) regions. As shown in Supplementary Fig. 4 there is no sign of replication when the struc-

tural region is evaluated but when using non-structural primers it is evident the amplification of the replicon, although in a much smaller extent than the positive control.

The possibility that translation was from input RNA appeared highly unlikely since other researchers have tested this hypothesis and demonstrated that replication-defective replicons cannot drive detectable protein synthesis at 48 h posttransfection (Alvarez et al., 2005a; Jones et al., 2005a; Khromykh and Westaway, 1997). The increase in the number of positive cells in the replicon transfected cultures is consistent with the need for viral replication, as the input RNA cannot produce detectable antigen unless it is amplified within the infected cells (Khromykh and Westaway, 1997).

Recently, it has been demonstrated the co-circulation of two different DENV-3 genotypes (III and V) in Brazil (Nogueira et al., 2008). DENV-3 belonging to genotype III has been associated to the development of more severe forms of the disease (Messer et al., 2003; Silva et al., 2008). We are currently engaged on the biological and genetic characterization of some DENV-3 clinical isolates obtained during epidemics in Brazil between 2002 and 2004 (Nogueira et al., 2008). Preliminary data point to some interesting differences in the non-structural proteins sequence which were associated with different viral phenotypes. The next step will be to insert molecular markers (luciferase or GFP) in the replicon system so that we can better evaluate the effects of these amino acid substitutions in the modulation of virus replication.

Acknowledgements

The authors are indebted with Paulo Arauco and Vanessa Stella for technical help with sequencing and cell cultures procedures, respectively. Financial support: Fiocruz, CNPq, CNPq/PROSUL, Fundação Araucária. ALPM and LB are supported by fellowships from CAPES. CNDs is a CNPq fellowship recipient.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jviromet.2009.09.004.

References

- Alvarez, D.E., De Lella Ezcurra, A.L., Fucito, S., Gamarnik, A.V., 2005a. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 339 (2), 200–212.
- Alvarez, D.E., Lodeiro, M.F., Ludeña, S.J., Pietrasanta, L.I., Gamarnik, A.V., 2005b. Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* 79 (11), 6631–6643.
- Barnes, W.M., 1977. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Science* 195, 393–394.
- Bredenbeek, P.J., Kooy, E.A., Lindenbach, B., Huijckman, N., Rice, C.M., Spaan, W.J., 2003. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J. Gen. Virol.* 84, 1261–1268.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., Rice, C., 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 649–688.
- Corver, J., Lenches, E., Smith, K., Robinson, R.A., Sando, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., 2003. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *J. Virol.* 77 (3), 2265–2270.
- Dèspres, P., Frenkiel, M.P., Deubel, V., 1993. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196 (1), 209–219.
- Gehrke, R., Ecker, M., Aberle, S.W., Allison, S.L., Heinz, F.X., Mandl, C.W., 2003. Incorporation of Tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. *J. Virol.* 77 (16), 8924–8933.
- Gentry, M.K., Henchal, E.A., McCown, J.M., Brandt, W.E., Dalrymple, J.M., 1982. Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 548–555.
- Gritsun, T.S., Gould, E.A., 1998. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. *J. Virol. Methods* 76, 109–120.
- Halstead, S.B., Chow, J.S., Marchette, N.J., 1973. Immunological enhancement of dengue virus replication. *Nat. New Biol.* 243, 24–26.
- Halstead, S.B., O'Rourke, E.J., 1977. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leucocytes. *Nature* 265, 739–741.
- Holden, K.L., Stein, D.A., Pierson, T.C., Ahmed, A.A., Clyde, K., Iversen, P.L., Harris, E., 2006. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology* 344, 439–452.
- Hurrelbrink, R.J., Nestorowicz, A., McMinn, P.C., 1999. Characterization of infectious Murray Valley encephalitis virus derived from a stably cloned genome-length cDNA. *J. Gen. Virol.* 80, 3115–3125.
- Ishikawa, T., Widman, D.G., Bourne, N., Konishi, E., Mason, P.W., 2008. Construction and evaluation of a chimeric pseudoinfectious virus vaccine to prevent Japanese encephalitis. *Virology* 26, 2772–2781.
- Jones, C.T., Patkar, C.G., Kuhn, R.J., 2005a. Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 331, 247–259.
- Jones, M., Davidson, A., Hibbert, L., Gruenwald, P., Schaalak, J., Ball, S., Foster, G.R., Jacobs, M., 2005b. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J. Virol.* 79 (9), 5414–5420.
- Kofler, R.M., Aberle, J.H., Aberle, S.W., Allison, S.L., Heinz, F.X., Mandl, C.W., 2004. Mimicking live flavivirus immunization with a noninfectious RNA vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (17), 1951–1956.
- Khromykh, A., Westaway, E., 1997. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J. Virol.* 71 (2), 1497–1505.
- Lo, M.K., Tilgner, M., Bernard, K.A., Shi, P., 2003. Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *J. Virol.* 77 (18), 10004–10014.
- Mason, P.W., Zugel, M.U., Semproni, A.R., Fournier, M.J., Mason, T.L., 1990. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.* 71, 2107–2114.
- Messer, W.B., Gubler, D.J., Harris, E., Sivananthan, K., De Silva, A., 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9 (7), 800–809.
- Ministério da saúde, 2006. Situação Epidemiológica da Dengue até Dezembro de 2006. Available at: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim.dengue.dez2006.pdf>>.
- Ministério da Saúde, 2007. Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007. Available at: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim.dengue.010208.pdf>>.
- Ministério da Saúde, 2008a. Informe epidemiológico da dengue Janeiro a Novembro de 2008. Available at: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim.dengue.janeiro.novembro.pdf>>.
- Ministério da saúde, 2008b. Casos confirmados de FHD, segundo ano de confirmação. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990–1991, 1994–2008. Available at: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos.conf.fhd.pdf>>.
- Mongkolsapaya, J., Dejnirattisai, W., Xu, X., Vasanawathana, S., Tagthawornchaikul, N., Chairunsri, A., Sawasdivorn, S., Duangchinda, T., Dong, T., Rowland-Jones, S., Yenchitsomanus, P., McMichael, A., Malasit, P., Screaton, G., 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat. Med.* 9 (7), 921–927.
- Ng, Y.C., Gu, F., Phong, W.Y., Chen, Y., Lim, S.P., Davidson, A., Vasudevan, S.G., 2007. Construction and characterization of a stable subgenomic dengue virus type 2 replicon system for antiviral compound and siRNA testing. *Antiviral Res.* 76 (3), 222–231.
- Nogueira, R.M.R., Araújo, J.M.G., Schatzmayr, H.G., 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. *Rev. Panam. Salud Publica.* 22 (5), 358–363.
- Nogueira, M.B., Stella, V., Bordignon, J., Batista, W.C., De Borja, L., Silva, L.H.P., Hoffmann, F.G., Probst, C.M., Santos, C.N.D., 2008. Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the northern region of Brazil during the 2002–2004 epidemics. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103 (5), 483–488.
- Pang, X., Zhang, M., Dayton, A.L., 2001. Development of dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. *BMC Microbiol.* 1, 18.
- Pierro, D.J., Salazar, M.I., Beaty, B.J., Olson, K.E., 2006. Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. *J. Gen. Virol.* 87, 2263–2268.
- Poersch, C.O., Pavoni, D.P., Queiroz, M.H., De Borja, L., Goldenberg, S., Dos Santos, C.N.D., Krieger, M.A., 2005. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. *J. Clin. Virol.* 32, 272–277.
- Rosen, L., 1977. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26 (3), 337–343.
- Rossi, S.L., Zhao, Q., O'Donnell, V.K., Mason, P.W., 2005. Adaptation of West Nile virus replicons to cells in culture and use of replicon-bearing cells to probe antiviral action. *Virology* 331, 457–470.
- Scholle, F., Girard, Y.A., Zhao, Q., Higgs, S., Mason, P.W., 2004. trans-packaged West Nile virus-like particles: infectious properties *in vitro* and in infected mosquito vectors. *J. Virol.* 78 (21), 11605–11614.
- Shi, P., Tilgner, M., Lo, M.K., 2002. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. *Virology* 296, 219–233.
- Silva, R.L.A., Silva, A.M., Harris, E., Macdonald, G.H., 2008. Genetic analysis of dengue 3 virus subtype III 5' and 3' non-coding regions. *Virus Res.* 135, 320–325.
- Suzuki, R., De Borja, L., Dos Santos, C.N., Mason, P.W., 2007. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology* 362 (2), 374–383.
- Widman, D.G., Ishikawa, T., Fayzulin, R., Bourne, N., Mason, P., 2008. Construction and characterization of a second-generation pseudoinfectious West Nile virus vaccine propagated using a new cultivation system. *Vaccine* 26, 2762–2771.
- Yamshchikov, V.F., Wengler, G., Perelegin, A.A., Brinton, M.A., Compans, R.W., 2001. An infectious clone of the West Nile flavivirus. *Virology* 281, 294–304.

- Yoshii, K., Holbrook, M.R., 2009. Sub-genomic replicon and virus-like particles of Omsk hemorrhagic fever virus. *Arch. Virol.* 154 (4), 573–580.
- Yun, S., Kim, S., Rice, C.M., Lee, Y., 2003. Development and application of a reverse genetics system for Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 77 (11), 6450–6465.
- Yun, S., Choi, Y., Yu, X., Song, J., Shin, Y., Ju, Y., Kim, S., Lee, Y., 2007. Engineering the Japanese encephalitis virus RNA genome for the expression of foreign genes of various sizes: Implications for packaging capacity and RNA replication efficiency. *J. Neurovirol.* 13 (6), 522–535.

ANEXOS

A. SOLUÇÕES E TAMPÕES

10x TBE: 890 mM Tris-base, 890 mM Ácido bórico, 20 mM EDTA (pH 8.0)

1xPBS: 137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5mM KH_2PO_4

1xPBS/glicerol: 1xPBS, 10% glicerol

Paraformaldeído 3%: solução de paraformaldeído 3% em PBS 1x. Pesar com máscara e dissolver na capela

SDS 10%: para 1 litro, dissolver 100 g de SDS em água ultrapura e filtrar em 0,45µm

Solução 2.5 mM dNTPs: mistura de 2.5 mM de cada desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP, Pharmacia)

Solução CaCl_2 /Hepes: 100 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES (pH 7.0)

Solução CaCl_2 /Hepes/glicerol: 100 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 10% glicerol estéril (pH 7.0)

Solução Carboxi Metil Celulose (CMC): 32% de CMC em água MQ, homogenizar até a dissolver

Solução Clorofórmio/Álcool isoamílico: 24 volumes de clorofórmio, 1 volume de álcool isoamílico

Solução de sacarose 30%: 30% de sacarose em tampão TNE. Preparar livre RNase

Solução de sacarose 60%: 60% de sacarose em tampão TNE. Preparar livre de RNase

Solução Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico: 25 volumes de fenol (pH 7,0, saturado com 10mM Tris-base) , 24 volumes de clorofórmio, 1 volume de álcool isoamílico

Solução Triton: 0,5% de triton X100 diluído em 1xPBS

Tampão da Fosfatase Alcalina (AP-BUFFER): 100 mM Tris-HCl pH 9.5 1M, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2

Tampão de amostra para DNA 10x: 25% Ficoll (tipo 400), 0.25% azul de bromofenol, 25% xylene cianol FF

Tampão STE: 10 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM NaCl 5M, 1 mM EDTA 0.5 M pH 8

Tampão TNE: 50mM tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1mM EDTA

B. MEIOS DE CULTURA

Leibovitz's L-15 Medium completo (Meio de cultura para célula de inseto C_{6/36}):

Meio L-15 comercial (GIBCO) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), Triptose e 25 µg/ml Gentamicina

Meio SOC: 2% Bactotripton, 0.5 % Extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose

Meio líquido TB1x (Meio de cultura “*Terrific Broth*” para *E.coli*): 12g/L Caseína digerida, 24g/L Extrato de levedura, 9.4g/L K₂HPO₄, 2.2g/L KH₂PO₄

Meio TB/Cloranfenicol: Meio TB1x suplementado com 15 µg/ml de cloranfenicol

Meio LB1x sólido (Meio de cultura “*Luria Broth*” para *E.coli*): 10g/L Bacto-Tripton, 5g/L Extrato de levedura, 5g/L NaCl, 15g/L ágar

Placas de meio LB sólido/Ampicilina: Meio LB1x sólido suplementado com 100 µg/ml de ampicilina

C. LINHAGENS BACTERIANAS DE *Escherichia coli*

TOP 10F' (Invitrogen): F' {lacIq Tn10 (TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1' araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

TOP10 (Invitrogen): F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG